カイコ前胸腺器官培養系の確立とその利用

東京大学大学院新領域創成科学研究科
先端生命科学専攻　分子認識化学分野

平成 **15** 年度入学
36508　大里　野恵

目次

序論

脱皮・変態の内分泌制御

脱皮・変態は、昆虫が成長し、子孫を残す成虫となるための重要な現象であり、複数のホルモンによる内分泌系によって制御される。その中で中心的な役割を果たすのが、エクジソンである。エクジソンはコレステロールを出発物質として前胸腺で生合成され、体液中に分泌された後、20-ヒドロキシエクジソン (20-Hydroxyecdysone , 20E) に変換される (大西英爾. 他., 1995)。一般にホルモン活性をもつのは 20E と考えられてきたが、エクジソンには 20E で代替できない生理活性があるという報告 (Gilbert et al., 2002) もあり、これらはエクジステロイドと総称される。エクジステロイドは、核内受容体を介して末梢器官に直接作用するホルモンであり、脱皮・変態は、各発育ステージで繰り返される急激な体内エクジステロイド濃度の変化とともに起こる (Satake et al., 1998)。

前胸腺のエクジソン分泌量の変動に関わるとされる因子は複数知られている (Fig. 0-1)。脳で合成され、アラタ体から分泌される前胸腺刺激ホルモン (Prothoracicotropic hormone, PTTH) は前胸腺のエクジソン分泌を誘導する。Fig. 0-2 に示すように、特に脱皮・変態の直前においては、PTTH の体内濃度の上昇に対応してエクジソン分泌量の増大がみられる (Mizoguchi et al., 2002; Mizoguchi et al., 2001; Satake et al., 1998)。一方、エクジソンとの相互作用により、脱皮・変態のどちらを誘導するかを決定する幼若ホルモン (Juvenile hormone, JH) は、前胸腺に対する作用として、エクジソン分泌抑制作用をもつことが報告されている (Dedos and Fugo, 1996; Mizoguchi and Kataoka, ; Sakurai et al., 1989; Stolarz, 1979)。さらに近年、エクジソン分泌を抑制する脳由来の調節因子、前胸腺抑制ペプチド (Prothoracicostatic peptide, PTSP) も同定された (Hua et al., 1999; Liu et al., 2004)。これらに加えて、体液中のエクジステロイドも、前胸腺のエクジソン分泌に対し、正負両方のフィードバック作用をもつことが示唆されている (Koolman, 1999; Sakurai and Williams, 1989; Takaki and Sakurai, 2003)。

前胸腺は発育の時間軸に沿ってエクジソン分泌活性が変化するだけでなく、PTTH や JH に対する応答能も変化する (Okuda, 1985)。こうした前胸腺の変化や、エクジソン分泌量の変動に対して、個々の調節因子がどのように関与しているのか、未だ不明な点が多い。

エクジソン生合成を担う **P450** 遺伝子群

エクジソンの生合成経路については、近年、生合成の最終段階を触媒する酵素がいくつか同定された (Chavez et al., 2000; Niwa et al., 2004; Warren et al., 2002)。エクジソンは、チトクローム P450 型水酸化酵素群による段階的な水酸化反応によって 5β-ケトジオールから合成されることがわかっている。前胸腺で発現する Cyp306a1-Bm (Phantom, Phm) 、Cyp302a1-Bm (Disembodied, Dib) および、Cyp315a1-Bm (Shadow, Sad) は、この順番にそれぞれ 5β- ケトジオールの 25 位、 22 位、 2 位の炭素を水酸化する。体液中でのエクジソンから 20E への変換は、真皮や脂肪体で発現する Cyp314a1-Bm (Shade, Shd) が触媒する (Petryk et al., 2003)。この他、Cyp307a1-Bm (Spook, Spo)もエクジソン生合成経路への関与が予想されている (Chavez et al., 2000)。生合成経路の前半については、コレステロールから７- デヒドロコレステロールへの変換、および、その運搬に関与することが予想される遺伝子が同定されている (Wismar et al., 2000) が、その機能や、５β- ケトジオール にいたるまでの反応機構は明らかになっていない。これまでに得られた知見をもとに作成された、植物ステロールから 20E までの生合成反応経路を Fig. 0-3 に示した (Gilbert, 2004)。

前胸腺の培養

前胸腺培養系を利用した研究は 1970 年代から広く行われている。調節因子を添加して前胸腺を培養し、エクジソン分泌量を測定することによって、前胸腺の活性検定 (Bollenbacher et al., 1975) や、PTTH 活性の定量 (Bollenbacher et al., 1979) などが可能である。しかしながら、一般的な培養法、すなわち、摘出した前胸腺を、通常の昆虫用培地中で培養する方法では、前胸腺は培養開始後数時間から２日ほどでエクジソン分泌を停止することが知られている (Bollenbacher et al., 1979)。Chino らは、培地へのリポタンパク質の添加と酸素供給により、吐糸期のカイコ前胸腺の長期培養に成功している (Chino and Sakurai, 1974)。しかしながら、分泌能が培養期間を通して維持されるか否かについての言及はされていない。一方、アワヨトウ (*Pseudaletia separata*) 終齢幼虫の前胸腺培養のための培地組成を検討した Komiya らの報告で、前胸腺細胞の高い生存率とエクジソン分泌量が確認された培地組成には牛血清アルブミン (Bovine serum albumin, BSA) が含まれていた (Komiya et al., 1998)。このように、培養系におけるエクジソン分泌能を維持するための示唆的なデータが蓄積されていたにも関わらず、前胸腺長期培養系は未だ確立されていない。

前胸腺の長期培養系に成功すれば、短期培養ではわからなかった知見、すなわち、調節因子の長期的な作用や、エクジソン生合成に関わる遺伝子の発現を調べることが可能であると考えられる。以上のことを背景に、本研究では、カイコ終齢幼虫を用いてエクジソン分泌能を維持した長期の前胸腺器官培養系を確立し、これを利用して、前胸腺に作用する

個々の調節因子のはたらきやエクジソン生合成・分泌に関与する分子の機能を明らかにすることを目的とした。
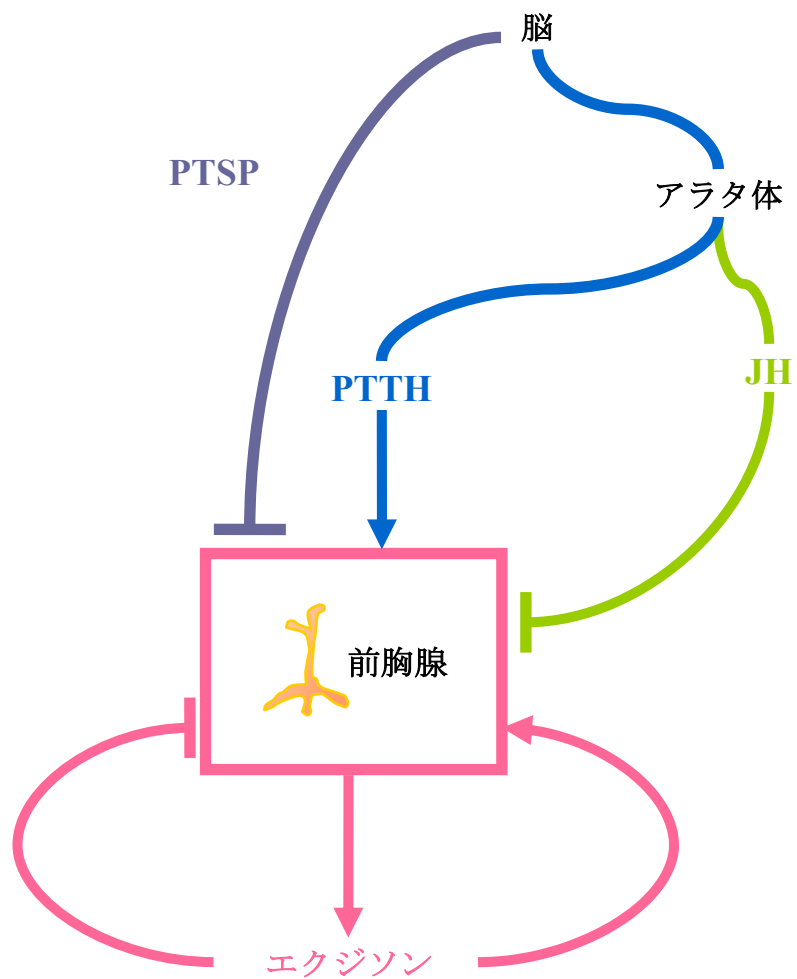
Fig. 0-1　前胸腺のエクジソン分泌変動に関わるとされる調節因子。
PTTH (青) 、JH (黄緑) 、脳由来の PTSP (藍) 、およびエクジソン (桃)。
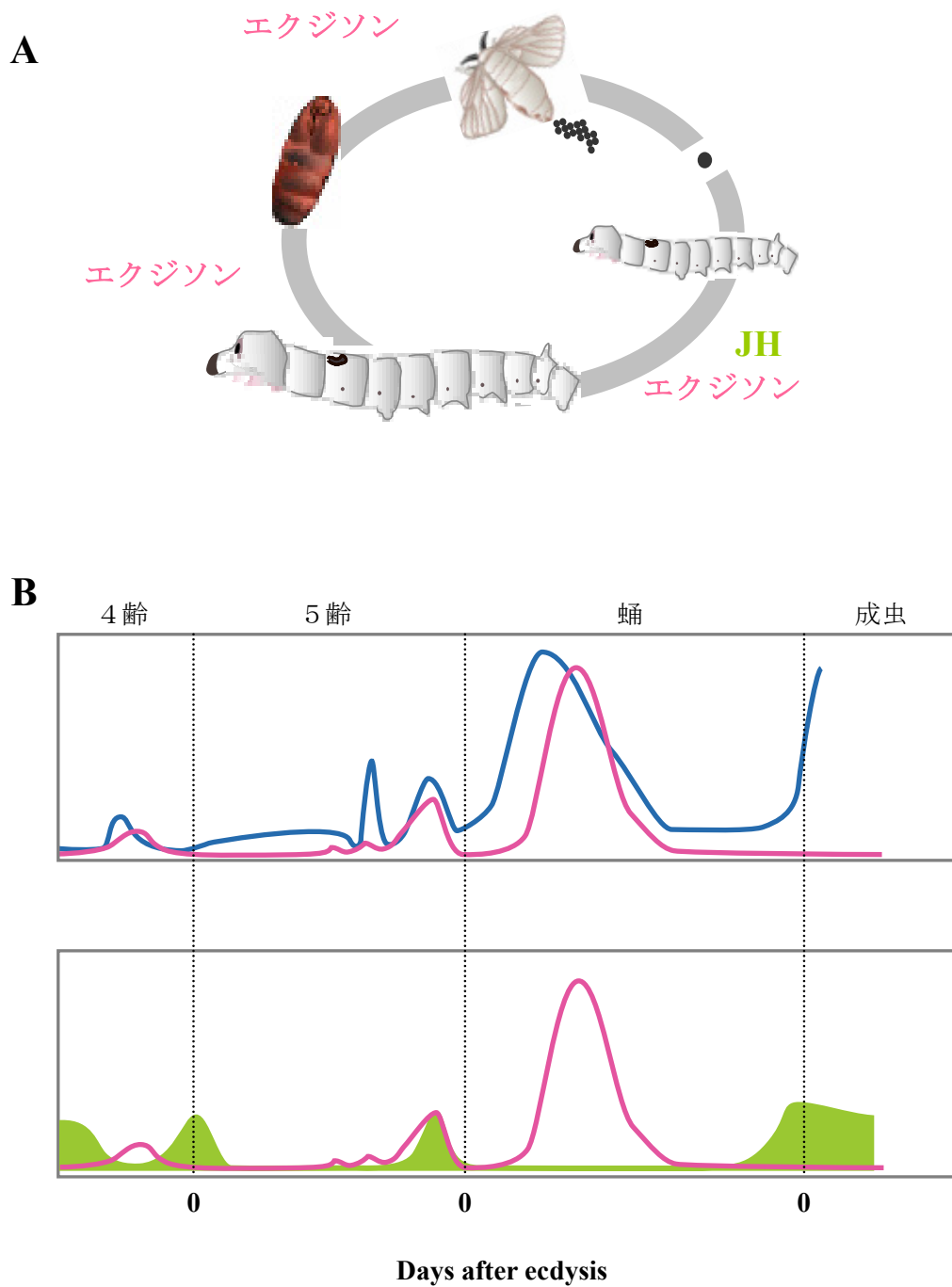
Fig. 0-2　脱皮・変態時のカイコ体液中ホルモン濃度の変化。
A：カイコの生活環と各発育段階の脱皮時に体液中に高濃度存在するホルモン。B：４齢から成虫までの体液中のエクジソン（桃）、PTTH (青) 、JH (黄緑) の濃度変化。
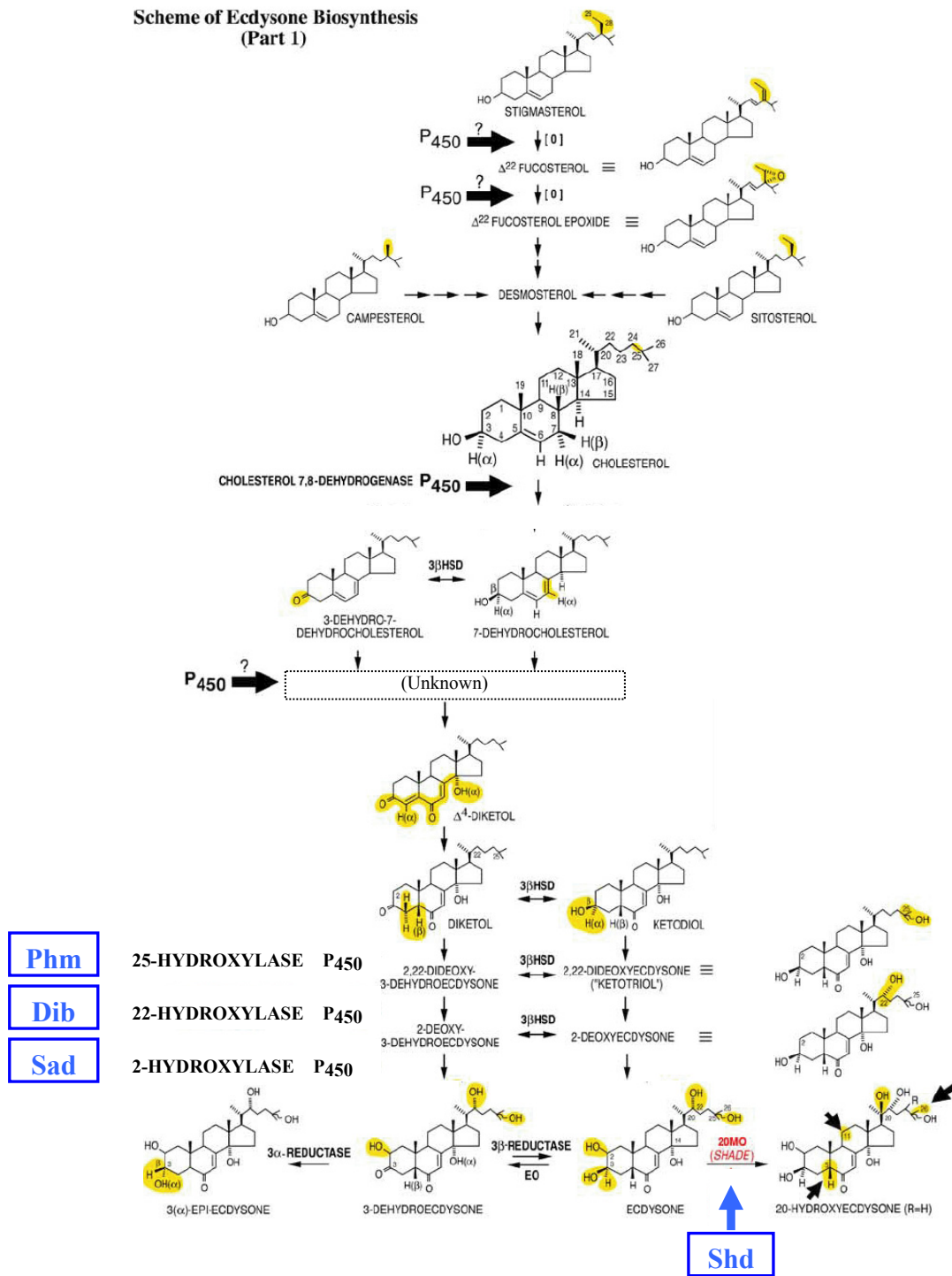
Fig. 0-3　植物ステロールから 20-ヒドロキシエクジソンへの生合成経路。
コレステロールからエクジソンまでの反応は前胸腺で起こると考えられている。クエスチョンマークは P450 が関与する可能性のある反応を示す。青色はすでに同定され、機能が明らかにされている P450 遺伝子を示す。また、黄色で酵素によって修飾を受ける箇所を示す。(2004, Gilbert を改変)

第１章　前胸腺器官培養系の確立

カイコでは４回目の脱皮を終えた５齢が終齢であり、この時期の幼虫では、幼虫から蛹、さらに成虫へと変態するための、大きな生理的変化が起きている。５齢期において、 PTTH などの調節因子の体内濃度はそれまでの４回の幼虫期とは大きく異なっており、また、調節因子に対する前胸腺の応答能も大きく変化することが明らかになっている。そこで、本研究では、各調節因子の作用を理解する上で、良い対象となる５齢幼虫に焦点を絞り、実験を行った。

1-1. エクジソン分泌能維持のための条件検討

以前、生体から摘出された前胸腺は、数時間後にはエクジソン分泌を停止することが知られていた。培養系におけるエクジソン分泌能を維持するためには、培養系の状態をより生体内に近づける必要があると考えられる。そこで、前胸腺の生体内における環境、状態、および、形態的特徴について考察した。(Fig. 1-1)

Fig. 1-1A に示したように、前胸腺は、第１気門の内側についた主部と、そこから頭部へ向かって気管の間を貫いて延びる枝部とからなる、数ミリメートルの、線帯状の器官である (石井象二郎., 1982)。前胸腺組織は結合組織や脂肪体と癒着しており、軟弱で切れやすい。また、粘着性の結合組織によって解剖器具や培養プレートに容易に付着する。

以上より、まず、前胸腺が近接する気管から極めて豊富な酸素供給を受けていることが予測された。次に、結合組織や脂肪体と複雑に絡み合っている前胸腺を単独で摘出することは、軟弱な組織に物理的ダメージを与えることが避けられず、安定した培養が期待できないことが推察された。また、前胸腺にはエクジソン生合成の出発物質であるコレステロールの貯蔵機能がないと考えられることから、継続したエクジソン生合成には、主な貯蔵器官である脂肪体からのコレステロール供給が必要であると考えられる(Fig. 1-1B)。

そこで、培養系において酸素供給、および、周辺組織との共培養が、エクジソン分泌能の維持に効果があるかを確かめるため、実験条件の検討を行った。
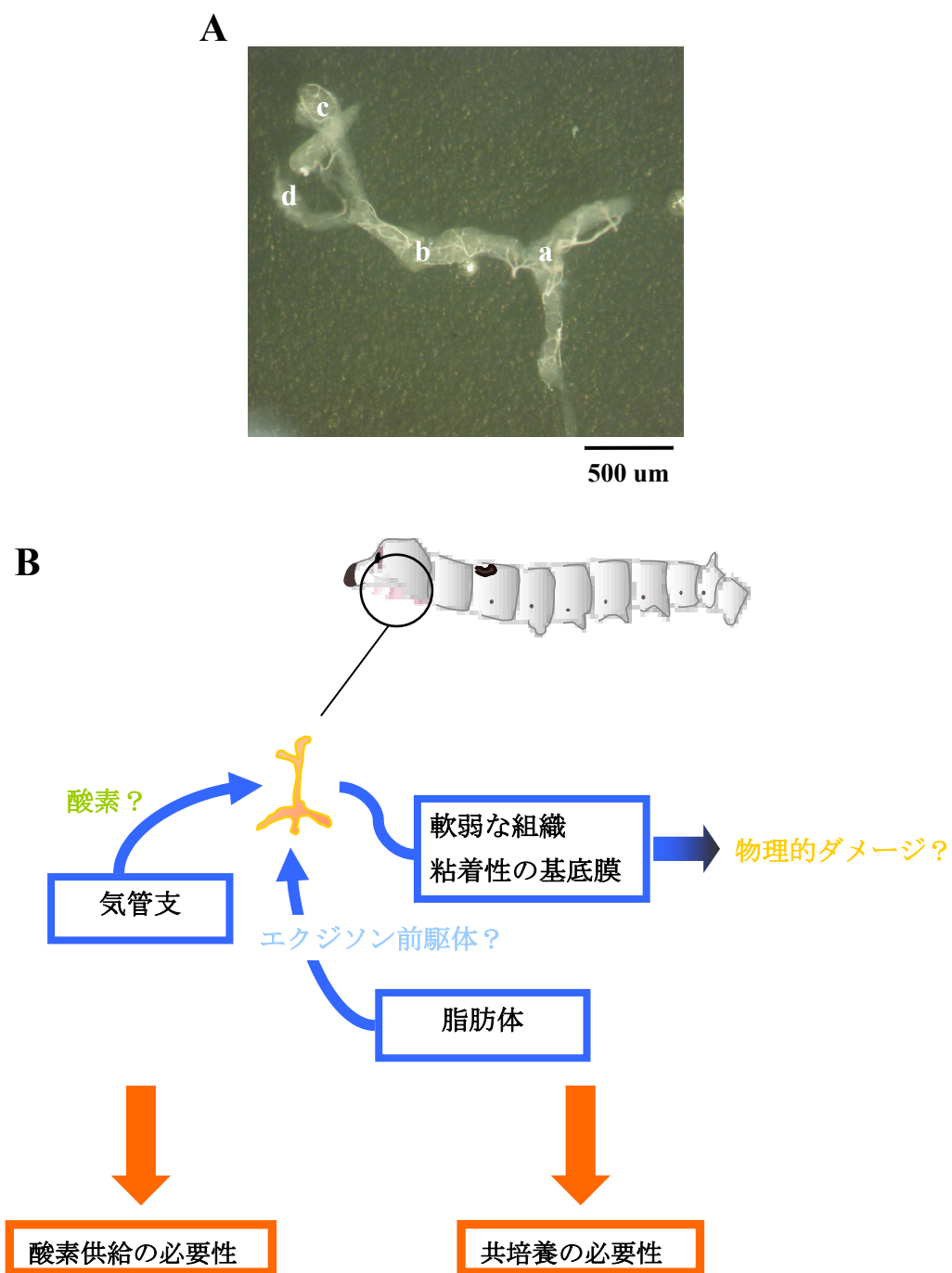
Fig. 1-1　エクジソン分泌能維持に必須な条件の予測。
A：カイコ V0 幼虫から摘出した前胸腺。主部（a）は第一気門の内側に位置する。枝部は気管の間を貫く幹枝（b)、脳側に伸びる前枝（c)、および、中枝（d）から成る。B：生体内の前胸腺についての考察と培養条件の仮説。

1-1-1. 酸素供給

高濃度酸素供給についてその必要性の検討を行うため、ガス置換デシケーターを培養設備として用いた。アクリル製のデシケーターに酸素を 70%まで充填し、コルクを閉じると、酸素濃度は 45-60%まで低下した後 24 時間はほぼ一定に保たれた。

無菌的に摘出した前胸腺を 7 日間培養し、デシケーターに酸素を充填しなかった場合 (20.9%) と、充填して酸素供給を行った場合 (45-60%) の、各日の培地中のエクジソン量をラジオイムノアッセイ (RIA) により測定した。酸素を充填しなかった場合のエクジソン量は 7 日間を通して検出限界値 (0.001 ng/gland) 以下であった。これに対し、酸素を充填した場合は 7 日間を通して、数十 pg/gland 程度のエクジソン分泌がみられた (Fig. 1-2)。

1-1-2. 周辺組織との共培養

前項で示したように、培養系における前胸腺のエクジソン分泌能の維持に、酸素供給が必須であることが明らかになった。次に、周囲の組織との共培養により、酸素供給培養系のエクジソン分泌を更に高めることができるかどうか調べた。

酸素供給条件下で、周辺組織を含まない前胸腺の単独培養と、周辺組織を含めた状態の共培養との比較を行った。前胸腺は、その周囲の気管、脂肪体、筋肉および、皮膚と共に摘出した。共培養におけるエクジソン分泌量は 7 日間を通して単独培養を上回った。また、培養開始から 3 日目以降は、単独培養した前胸腺の約半数 (26 個体 52 個中 24 個) が、検出限界値以下であった(Fig. 1-3)。

そこで、改めて、共培養の状態で、酸素供給の有無によるエクジソン分泌量の違いを調べた。共培養で酸素供給を行った前胸腺のエクジソン分泌は 2 日目以降に大きく増大し、最大で数 ng/gland のピークを形成した (Fig. 1-4)。これに対し、共培養で酸素供給を行わなかった前胸腺のエクジソン分泌量はほぼ検出値以下であった。 3 日目から酸素供給を行った場合は、 4 日目以降にエクジソン分泌量が徐々に増大したが、初日から酸素供給を行った場合のようなピークはみられなかった。

以上より、培養系における前胸腺のエクジソン分泌能の維持に酸素供給および、周辺組織との共培養が必要であることが明らかになった。構築した培養手法を Fig. 1-5 に示した。
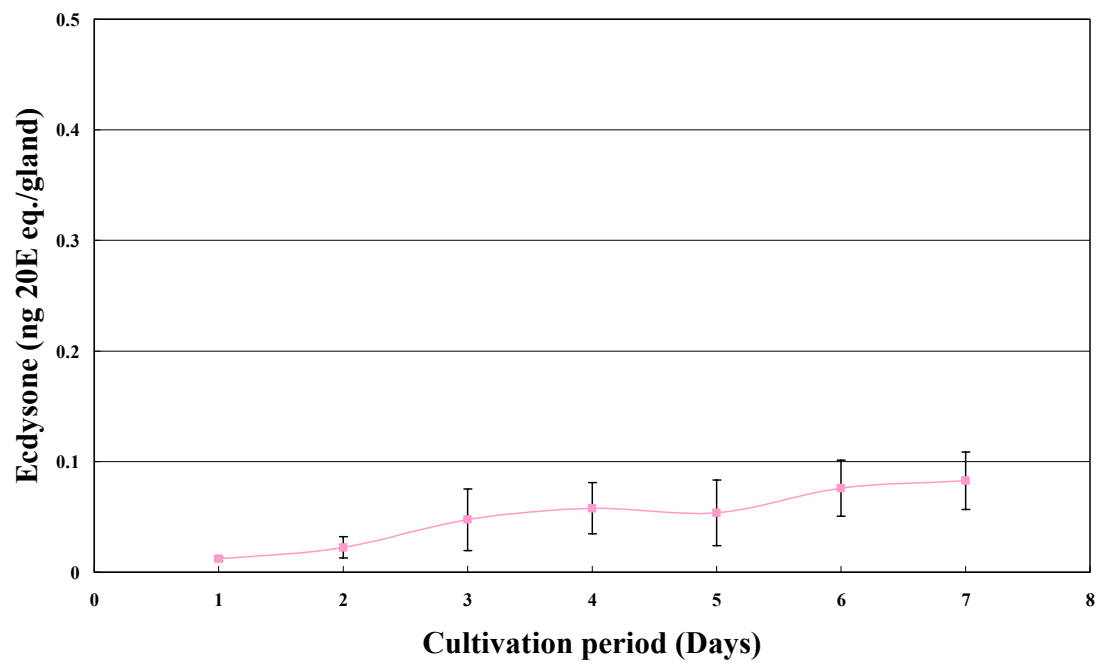
Fig. 1-2　培養系における酸素供給の効果。
45-60% の酸素供給条件下で培養し、24 時間ごとに交換した培地中エクジソン量を測定した。平均値±標準誤差。n=18-34。
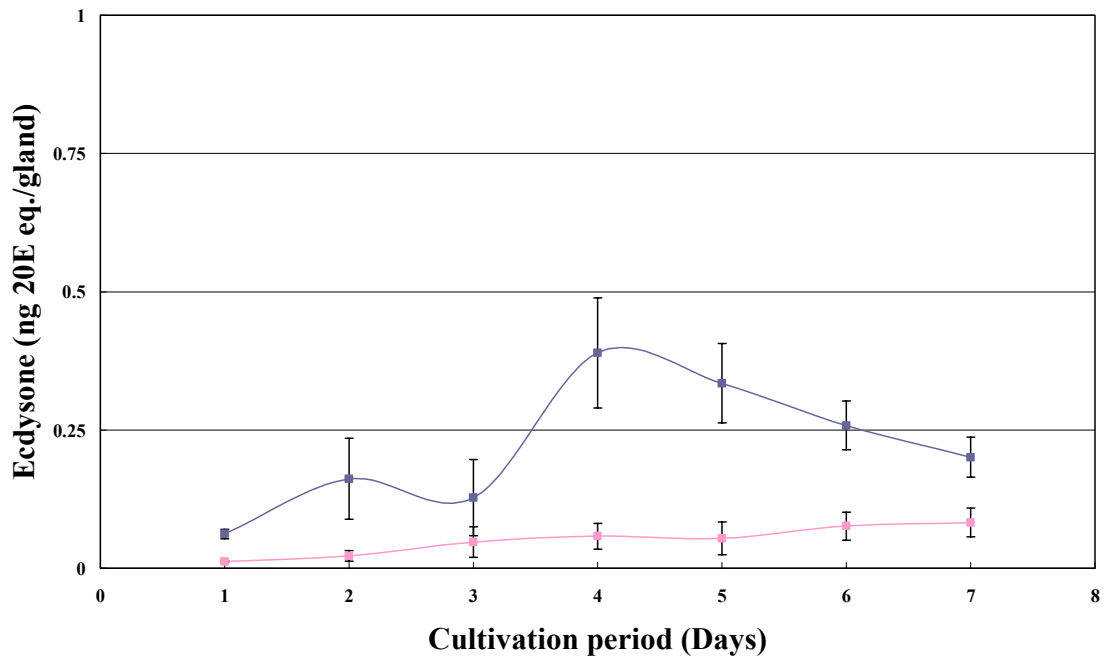
Fig. 1-3　酸素供給培養系における共培養の効果。
酸素供給条件下で、共培養（藍）と前胸腺単独培養（桃）を行い、24 時間ごとに交換した培地中エクジソン量を測定した。培養は 45-60% 酸素供給下で行った。平均値±標準誤差。n=18-37。
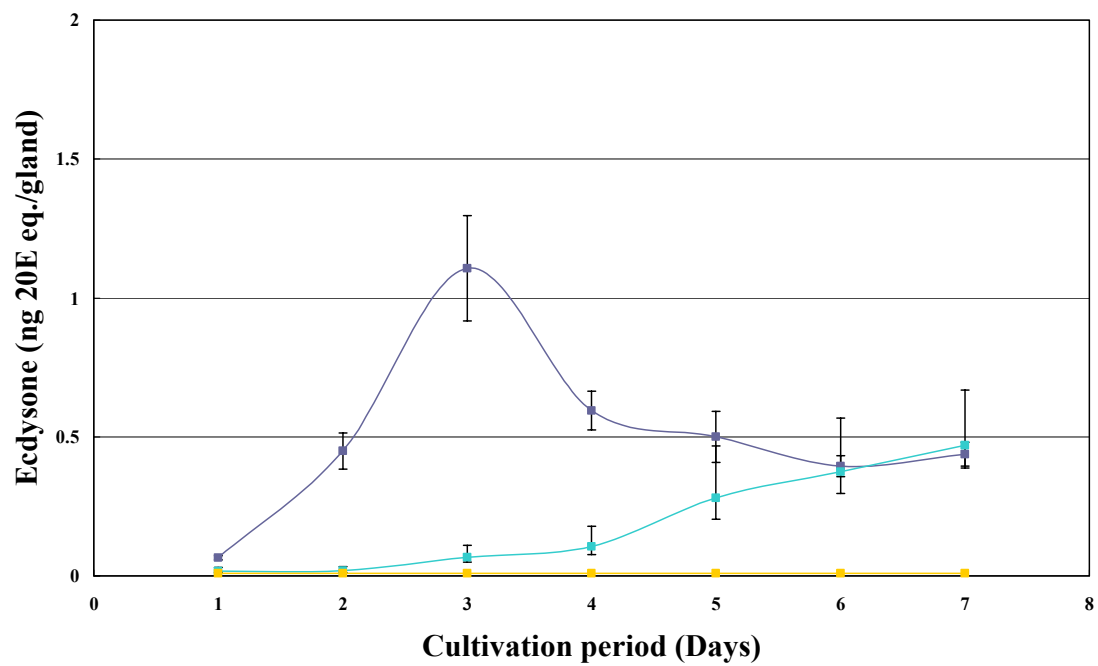
Fig. 1-4　共培養系における酸素供給の効果。
周辺組織との共培養において、45-60％の酸素供給を行った場合（藍）、３日目から酸素供給を開始した場合（水色）および、酸素供給を行わなかった場合（黄）。24 時間ごとに交換した培地中エクジソン量を測定した。平均値±標準誤差。n=12-56。

前胸腺器官培養系

カイコ幼虫を 70 % Ethanol 中で麻酔し、洗浄後、無菌的に解剖

解剖用調製培地中で、前胸腺と周囲の組織を摘出
(Vannas-style spring scissors 使用)

解剖用調製培地で洗浄
解剖用調製培地中でプレインキュベート（1-60 分間）

100 μl の培養用調製培地に移動（96 well マイクロプレート 使用）

酸素を充填したインキュベーター内にプレートを置き、培養開始

１日ごとに酸素充填を行うと同時に、培地を交換

回収した培地中のエクジソン量を RIA により測定
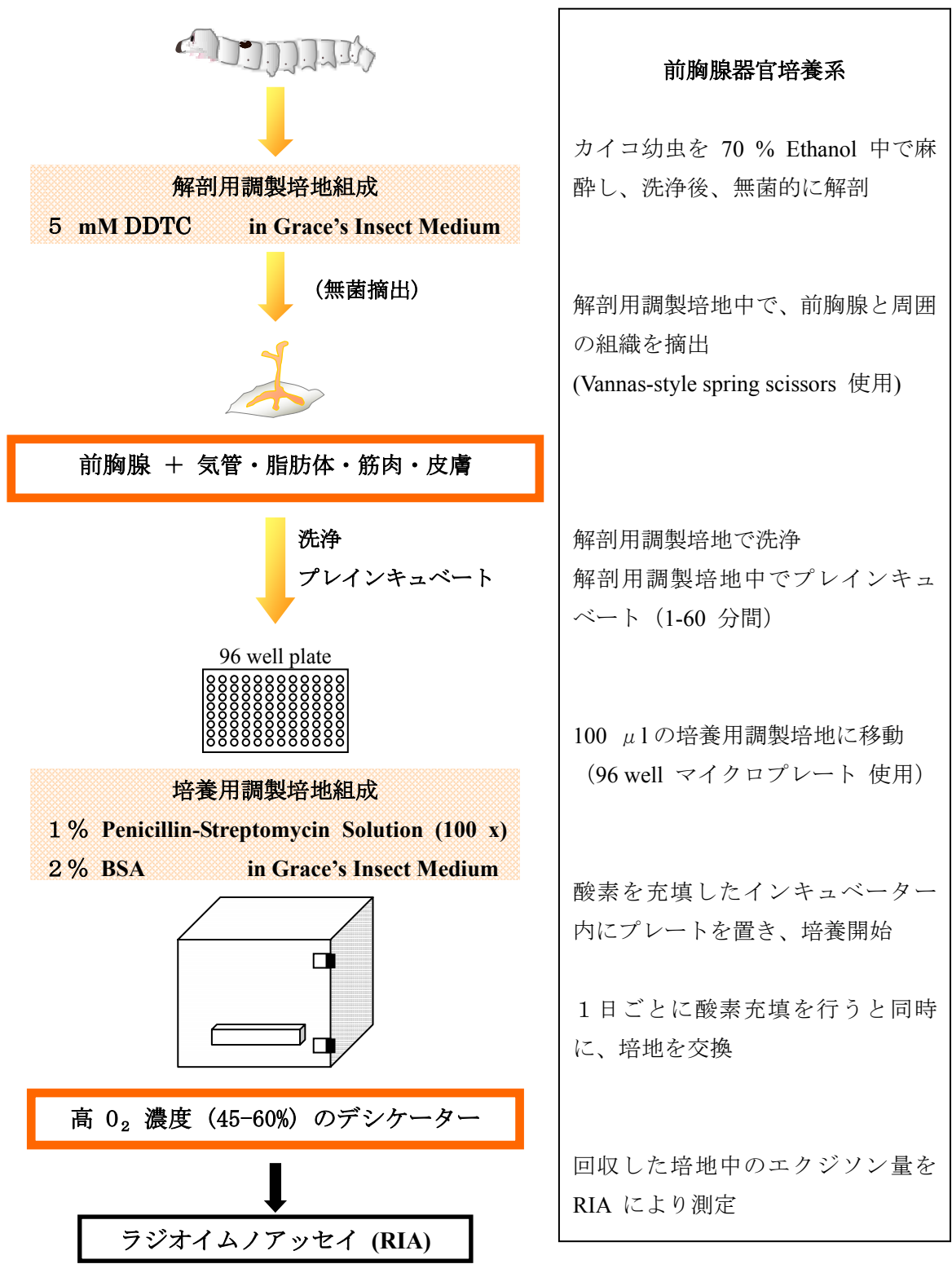
Fig. 1-5 前胸腺器官培養系。

1-2. 分泌調節因子を添加しない培養系におけるエクジソン分泌

酸素供給、および、周辺組織との共培養を、エクジソン分泌能を維持するための２条件として設定し、以下全ての実験を行った。なお以降、「単独」という表現を伴わない限り、前胸腺とは、周辺組織を含んだものを指す。

前項で示したように、構築した培養系では PTTH などの調節因子が添加されていないにもかかわらず、エクジソン分泌が観察された。５齢０日目 (V0 ; 以降５齢幼虫の発育段階は、脱皮後の日数に応じて V0-6 と表記する。) の幼虫から摘出した前胸腺の培養系におけるエクジソン分泌量の変動を、Fig. 1-6 に示した。エクジソン分泌量は、培養開始１日目は低く、２日目以降に１回大きく増大し、ピークを迎えた後、徐々に減少した。しかしながら、エクジソン分泌能はその後ゼロにはならず、 10 日間以上持続した。分泌ピークは２～５日目のいずれかで観察され、培養ロット（同じ日に孵化した集団）ごとにばらつきが見られたが、同一ロット内では、ほぼ同一の日にピークがあった。ピーク時の分泌量は数十 pg ～数 ng/gland であり、個体によるばらつきが大きかった。

V0 培養前胸腺のエクジソン分泌量の変動において最も特徴的であったのは、培養１日目の分泌量が数～数十 pg/gland と低かった点である。これに対し、V4 幼虫から前胸腺 (V4 前胸腺) を摘出し、培養系における分泌量を測定した場合、前胸腺は培養１日目から数 ng/ml の分泌量を示し、2-3 日目にピークがみられた (Fig. 1-7A)。一方、V6 幼虫の前胸腺 (V6 前胸腺) を培養した場合では１日目が数 ng/ml で最も高く、翌日には急激に減少した (Fig. 1-7B)。

酸素供給条件下で周辺組織との共培養を行った実験 (Fig. 1-6)において、７日間の培養期間中エクジソン分泌量がほとんど検出されなかったサンプルがあった。そこで、培養後に組織片の解剖、観察を行ったところ、JH の分泌器官であるアラタ体が混入していたことがわかった。そこで改めて、アラタ体を含めた前胸腺の共培養を行った結果、エクジソン分泌量は７日間を通して検出限界値以下であった(Fig. 1-8)。
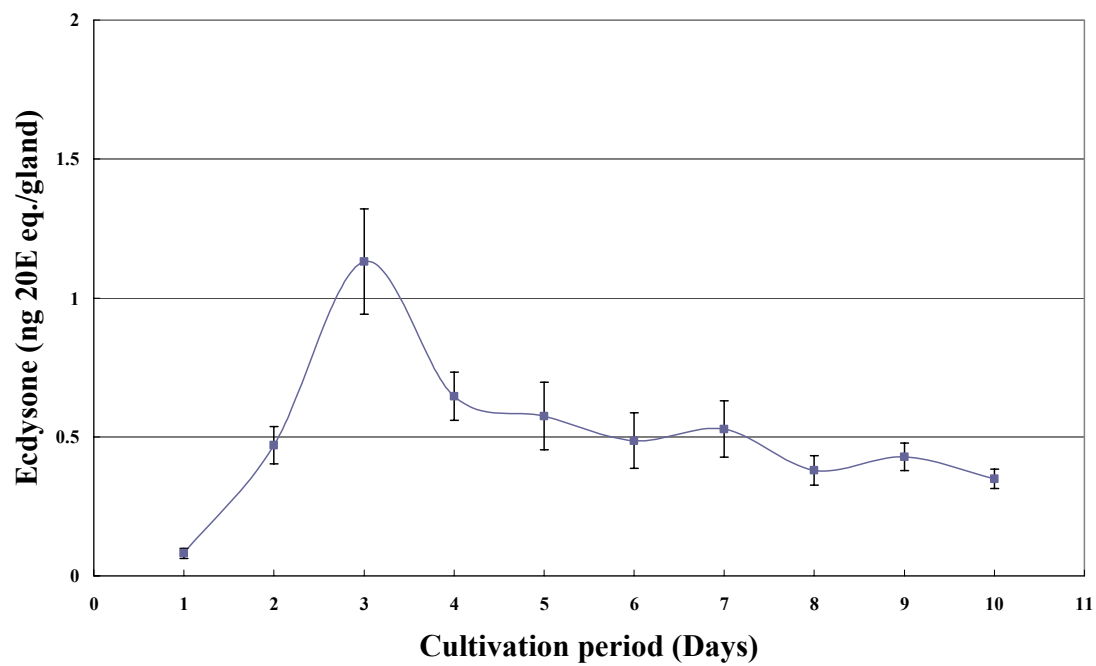
Fig. 1-6　V0 前胸腺の、培養系におけるエクジソン分泌量の変動。
24 時間ごとに交換した培地中のエクジソン量を測定した。平均値±標準誤差。n=56 (Day 1-8)、14 (Day 9-10)。
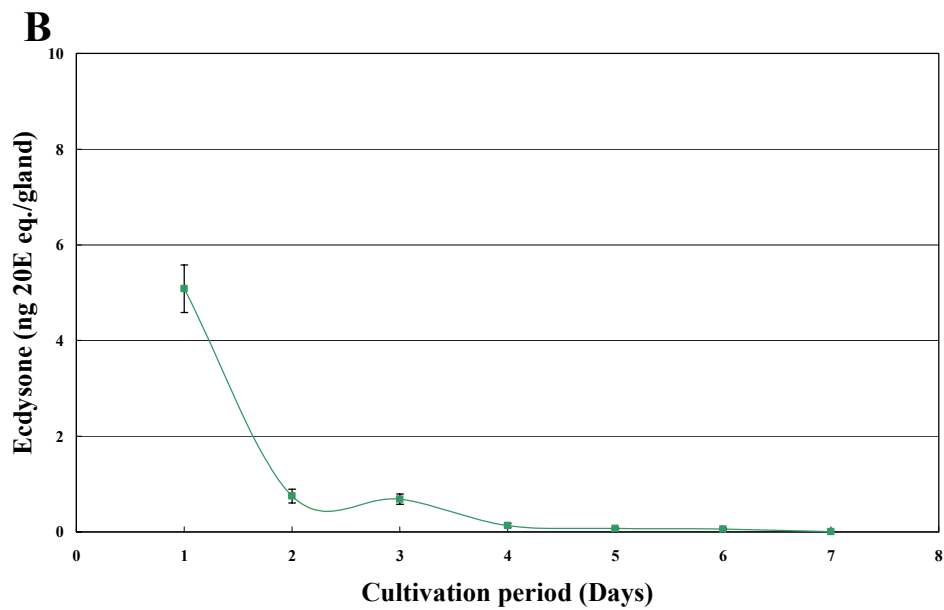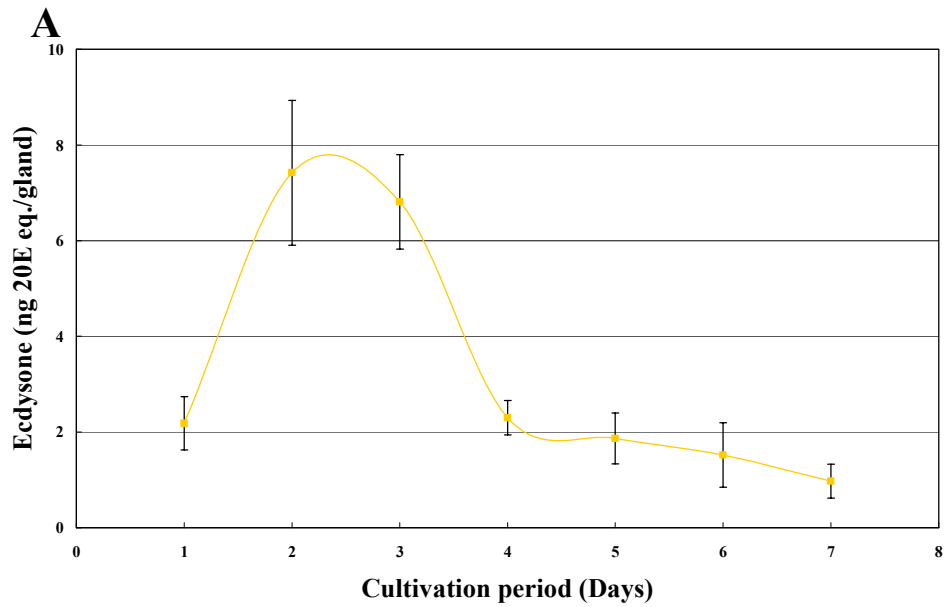
Fig. 1-7　５齢後期幼虫から摘出した前胸腺の、培養系におけるエクジソン分泌量の変動。V4 (A)、V6 (B)。24 時間ごとに交換した培地中のエクジソン量を測定した。平均値±標準誤差。n=11 (A)、18 (B)。
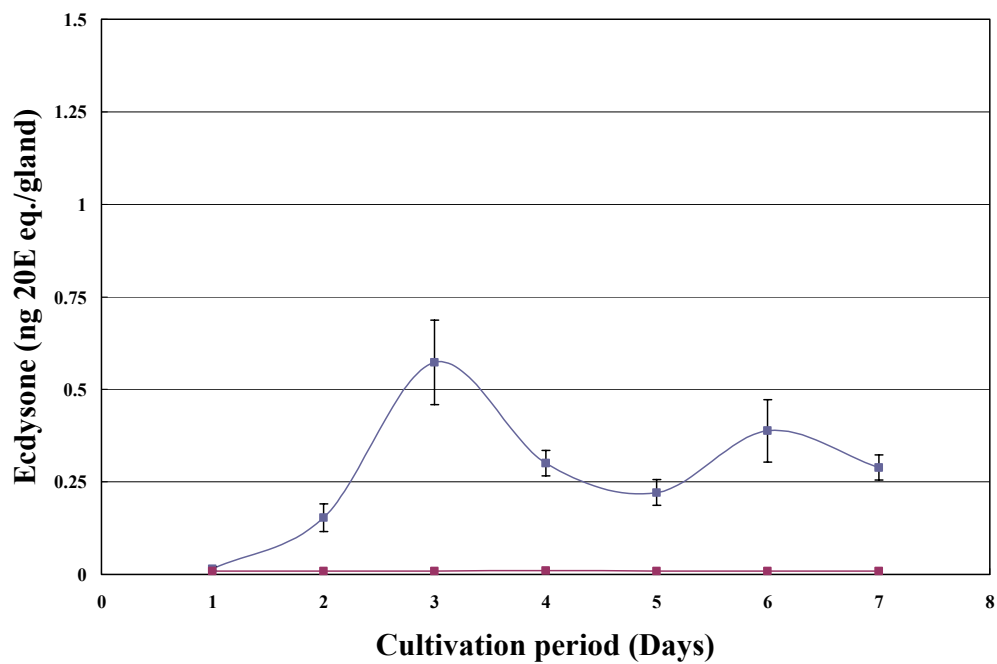
Fig. 1-8　アラタ体を含めた前胸腺の共培養。
アラタ体を含む培養系 (紫)と含まない培養系（藍）におけるエクジソン分泌。24 時間ごとに交換した培地中のエクジソン量を測定した。平均値±標準誤差。n=6-10。

1-3. まとめと考察

前胸腺培養系の構築における最大の課題は、前胸腺エクジソン分泌能の維持であった。本研究では、前胸腺を周辺の皮膚・脂肪体・気管と共培養し、また培養系に高濃度の酸素供給を行うことで、前胸腺のエクジソン分泌能を維持することに成功した。

酸素供給の生理的意味

本研究で、酸素供給がエクジソン分泌能の維持に必須な条件であることを示した (Fig. 1-3 、1-4)。前胸腺が第一気門から伸びる気管の束に沿うように位置することから、生体内においても前胸腺が豊富な酸素供給を受けていることが予想されるが、培養系で設定した45-60%の酸素濃度が生体内の環境を反映するものであるかどうかは不明である。

共培養の必要性

Fig. 1-2 に示したように、酸素供給を行った状態で前胸腺の単独培養を行うと、前胸腺の多くはエクジソン分泌量が少ないが、一部のサンプルでは、培養初期に共培養系と同程度から数倍のエクジソン分泌がみられた。しかし、これらのエクジソン分泌量は、培養後期には検出限界値付近まで減少していた。こうしたサンプルでは、解剖・摘出操作の刺激によって前胸腺が一過的にエクジソンを分泌している可能性がある。周辺組織との共培養は、物理的ダメージを回避するだけでなく、こうした人為的な活性化を避ける点でも有効であると考えられる。

V0 前胸腺の自発的エクジソン分泌

前胸腺培養系において最も注目すべき発見は、V0 前胸腺が自発的に分泌能を獲得した点 (Fig. 1-6) である。生体内では、V0 幼虫の前胸腺は、エクジソンをほとんど分泌せず、PTTH にも応答しない不活性化状態にあり、これが生体内の調節因子の作用で、発育段階の進行に伴って活性化されると考えられている。培養系でエクジソン分泌が確認されたことから、前胸腺は生体内の調節因子の誘導がなくても、自発的に活性化しエクジソン分泌を開始することが明らかになった。その機構としては、培養系に存在するエクジソンによる正のフィードバック作用が予想される。今後、培養系へのエクジソン添加実験を行い、エクジソンにより前胸腺のエクジソン分泌が高まるのか、また、逆に大量のエクジソンによる負のフィードバック作用はないのかを、明らかにしたい。

培養前半のエクジソン分泌

５齢幼虫の体内エクジステロイド濃度は、V0 において最も低下する。エクジステロイドの体内濃度は V3 までの間は数 pg/ml に保たれ、1 ng/ml を越えることはないが、V4 の初めから数回のピーク (数～数十 ng/ml) を伴って変動しながら徐々に増大し、脱皮直前に

は数百〜千 ng/ml となる (Mizoguchi et al., 2001; Satake et al., 1998)。培養開始から 2-3 日目までのエクジソン分泌量の変動に注目すると、V0 、V4 、および V6 幼虫から摘出した前胸腺はそれぞれ、相当する発育ステージにおける体内エクジステロイド濃度の変動に類似した挙動を示した（Fig. 1-6 、1-7）。解剖直前の体内の調節因子の作用が、培養開始後も 1〜数日間残ることにより、培養前半では生体内の状態が再現されていると考えられる。

培養後半のエクジソン分泌

培養後半ではエクジソン分泌量は減少する。その原因の 1 つは、前胸腺の細胞機能の低下と考えられる。顕微鏡下の観察では、培養開始直後と 7 日目とで、前胸腺細胞の形態には明確な差はみられなかった。しかしながら、V4 幼虫から摘出した前胸腺では、PTTH による細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が観察されるのに対し、培養系 4 日目の前胸腺ではカルシウムイオン濃度の上昇は観察されなかった（データ示さず)。カルシウムイメージング実験では、前胸腺を周辺組織から単離し、還流装置に糸で固定する。数日の培養期間を経て細胞機能が低下したために、前胸腺がこうした実験操作に耐えられなかった可能性がある。

エクジソン分泌量が減少する原因の第 2 点目として、エクジソン生合成の前駆体が不足し始めていると考えられる。しかしながら、一部の単独培養前胸腺で比較的高いエクジソン分泌が観察されたことから、数 pg 〜数 ng 程度のエクジソンを数日間分泌し続けるために前胸腺外からの前駆体供給が必須であるとは考えにくい。培養系において、生体内と同様に前駆体の運搬・取り込みが行われているのか、また、脂肪体との共培養によって実際に前胸腺への前駆体の供給が起きているのかといったことは、今後、培養後半における脂肪体の添加、あるいは、培地へのコレステロール添加などを行うことによって明らかになると考えられる。構築した培養系では、Grace’s Insect Medium に BSA を添加した培地を使用した。*Pseudaletia separata* 終齢幼虫の前胸腺培養のための培地組成を検討した Komiya らの報告で、前胸腺細胞の高い生存率とエクジソン分泌量が確認された培地組成には BSA が含まれていた (Komiya et al., 1998)。BSA が培養系における脂質運搬に寄与している可能性についても今後、検討したい。

アラタ体によるエクジソン分泌抑制

アラタ体を共培養した前胸腺ではエクジソン分泌が観察されなかった(Fig. 1-8)。アラタ体は、前胸腺に対するエクジソン分泌の抑制作用が報告されている JH の分泌器官である。この結果は、アラタ体が分泌する JH が、培養前胸腺に対して抑制作用をもつことを示唆する。培養系に JH 自体を添加した場合にも抑制作用がみられるのか、また、その作用に時期特異性があるのか、といったことに興味が持たれた。そこで JH アナログであるメソプレンの添加実験を行った。これについては第 3 章に示した。

第２章　培養前胸腺におけるエクジソン生合成関連遺伝子の発現

前章で示したように、培養系では、V0 前胸腺が自発的にエクジソン分泌能を獲得するという興味深い現象がみられた。この培養系における前胸腺のエクジソン分泌量の変化が、エクジソン生合成に関与する遺伝子の発現量の変動と対応しているかどうかに興味が持たれる。そこで、すでにエクジソン生合成に関与することが明らかになっている P450 遺伝子について、培養前胸腺における発現量の変動を調べた。以降の実験は全て、V0 前胸腺を用いた。したがって以降、特記しない限り、前胸腺とは V0 前胸腺を指す。

2-1. P450 遺伝子の発現量の変動

培養開始から 1-5 日後に前胸腺を回収し、エクジソン生合成経路において水酸化反応の触媒酵素である、*Phm*、 *Dib*、*Sad*、 および、エクジソン生合成経路への関与が予想されている *Spo* について遺伝子発現量の変動を Real time RT-PCR 法により調べた。

実験に用いたロットのエクジソン分泌量のピークは５日目であった (Fig. 2-1 青線)。培養前胸腺における *Phm* の発現量は、培養２日目に減少した後、徐々に増大し、エクジソン分泌ピークである５日目において最も高い発現がみられた (Fig. 2-1A)。*Dib* の発現量も培養１日目から徐々に増大し、分泌ピーク前日の４日目に最大の発現がみられたが、５日目には減少していた (Fig. 2-1B)。*Sad* の発現量は５日間を通して、大きな変動がみられなかった (Fig. 2-1C)。*Spo* については、１日置きに発現量の増大と減少を繰り返しながら徐々に上昇する傾向が見られ、５日目に最も上昇していた (Fig. 2-1D)。
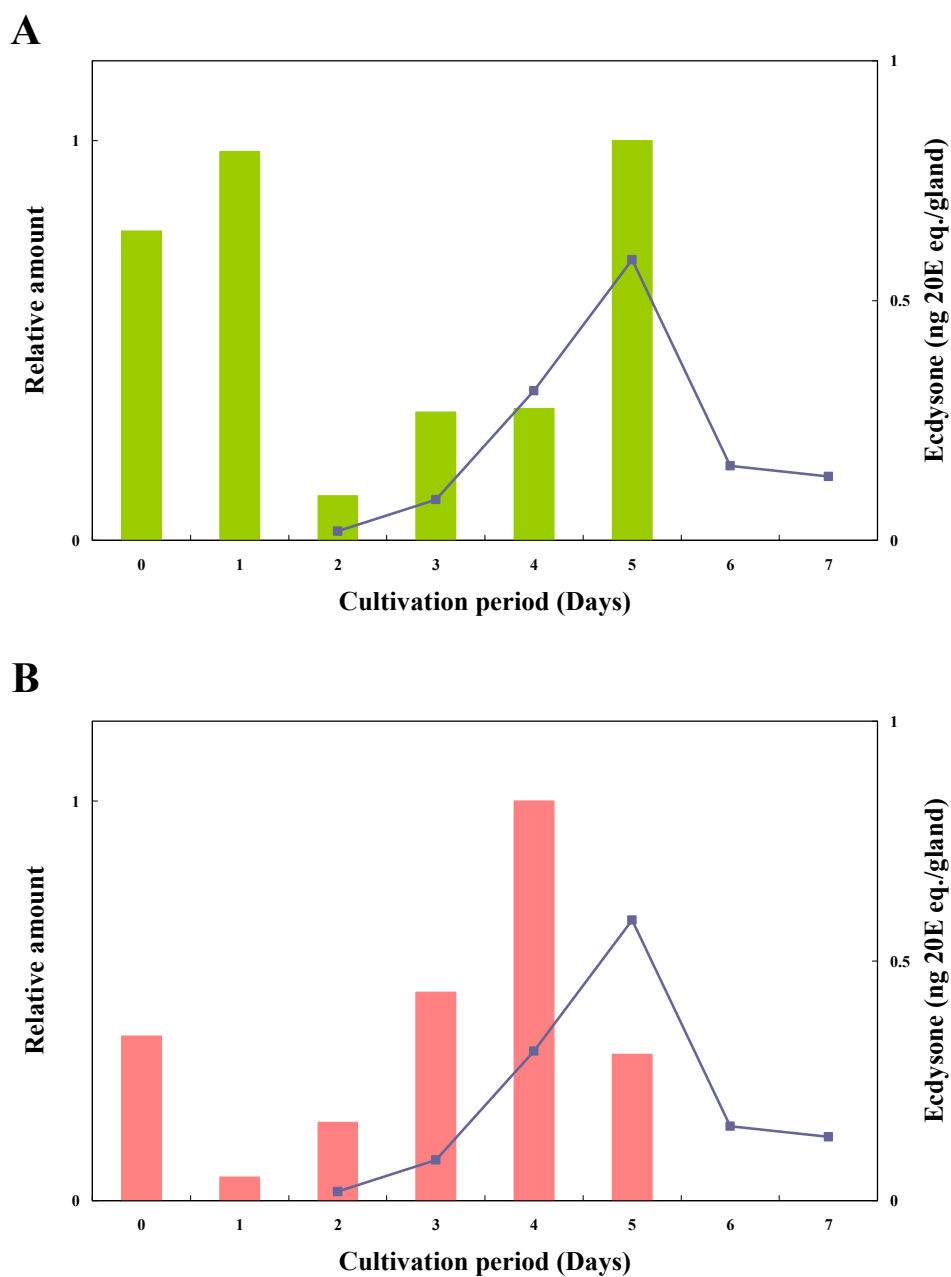
Fig. 2-1　P450 遺伝子の発現量の変動とエクジソン分泌量の変動（その１）。
棒グラフ：遺伝子の発現量。前胸腺は培養開始後 24 時間ごとに 12 個ずつ回収し、real time-RT PCR により発現量を調べた。発現量は、培養 1-5 日で最も発現量の大きかった日を１とする相対量で示した。折れ線グラフ：同じ条件で培養した同一ロットのエクジソン分泌量の変動。*Phm* (A) 、*Dib* (B) 、*Sad* (C) 、*Spo* (D)。平均値。n=1 (12)*（発現量）、12（エクジソン分泌量）。
＊total RNA は同時に回収した前胸腺 12 個からまとめて抽出した。以降、このような場合を n=1 (12) と表記する。
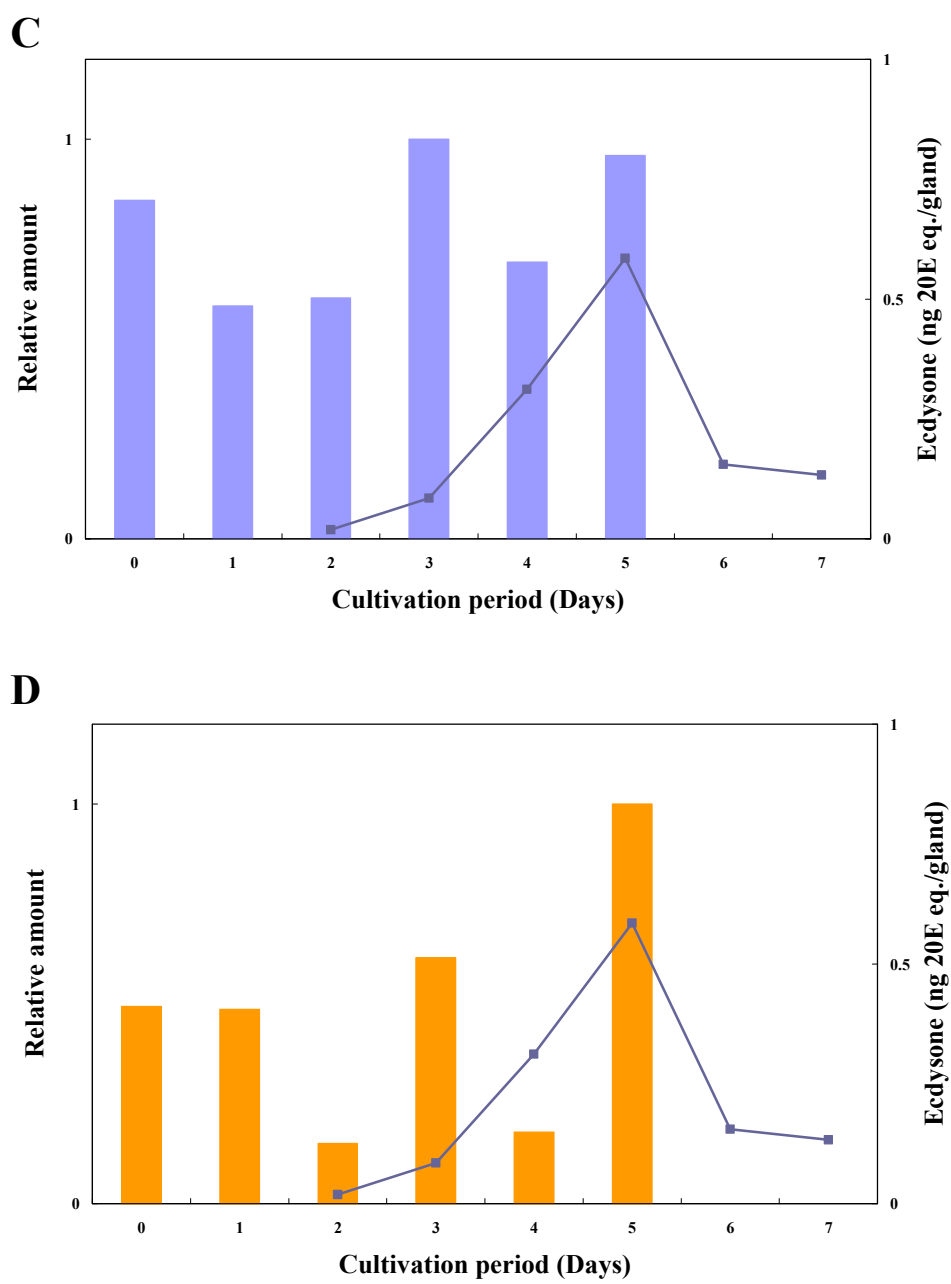
Fig. 2-1　P450 遺伝子の発現量の変動とエクジソン分泌量の変動（その２）。

2-2. まとめと考察

培養前胸腺における P450 遺伝子の発現量の変動は、*Phm* や *Dib* のように、エクジソン分泌量の変動と相関のみられたものと、*Sad* や *Spo* のように明確な相関のみられなかったものとに分かれた。また、*Phm* 、*Dib* 、および *Spo* の発現量の変動が明確なピークを示したのに対し、Sad では明確なピークはみられなかった。

前胸腺におけるエクジソン生合成経路において Phm 、Dib 、Sad は、この順番にそれぞれ５β-ケトジオールの 25 位、 22 位、 2 位を水酸化する (Fig. 0-2)。生体内において、これら 3 つの遺伝子および *Spo* の発現量は、５齢初期ではいずれも低く、体内エクジステロイド濃度の増大に先立ってまず、*Sad* の発現量が増大し、ワンダリング期の初めまで、発現量の多い状態が続く。*Phm* の増大は５齢の後半に見られ、*Dib* 及び *Spo* はさらにこれに遅れてエクジステロイド濃度が最も高まるワンダリング期に増大がみられる (Fig. 2-2)。

前章でも述べたように、培養系に移された前胸腺の細胞機能が生体内と比較して低下している可能性は否定できない。しかしながら、生体内で不活性化状態にある V0 前胸腺を用いた培養系で見られるエクジソン分泌は、生体内の調節因子から切り離された前胸腺の自発的な分泌である。４つの P450 遺伝子の発現がみられる時期や順序について、生体内と培養系との間には相違があった。このことは、これら遺伝子の生体内における発現が、培養系には存在しない因子の影響を受けていることを示すものである。

また、*Phm* 及び *Dib* が鋭いピークを形成するような発現量の変動を示すのに対し、*Sad* が数日に渡り安定して存在するという変動パターンの違いがみられたことから、*Phm* と *Dib* の発現制御は *Sad* の発現制御とは異なる機構で行われている可能性がある。なお、この変動パターンの特徴は生体内における各遺伝子の変動パターンの特徴と一致していた (Fig. 2-2)。

培養系に PTTH 、JH 、エクジソンなどの調節因子を添加し、培養系前胸腺のエクジソン分泌量および、遺伝子発現量の変動パターンがどのように変化するか観察することで、生体内で見られる複雑な制御メカニズムにおける各調節因子の役割を明らかにすることができると考えられる。
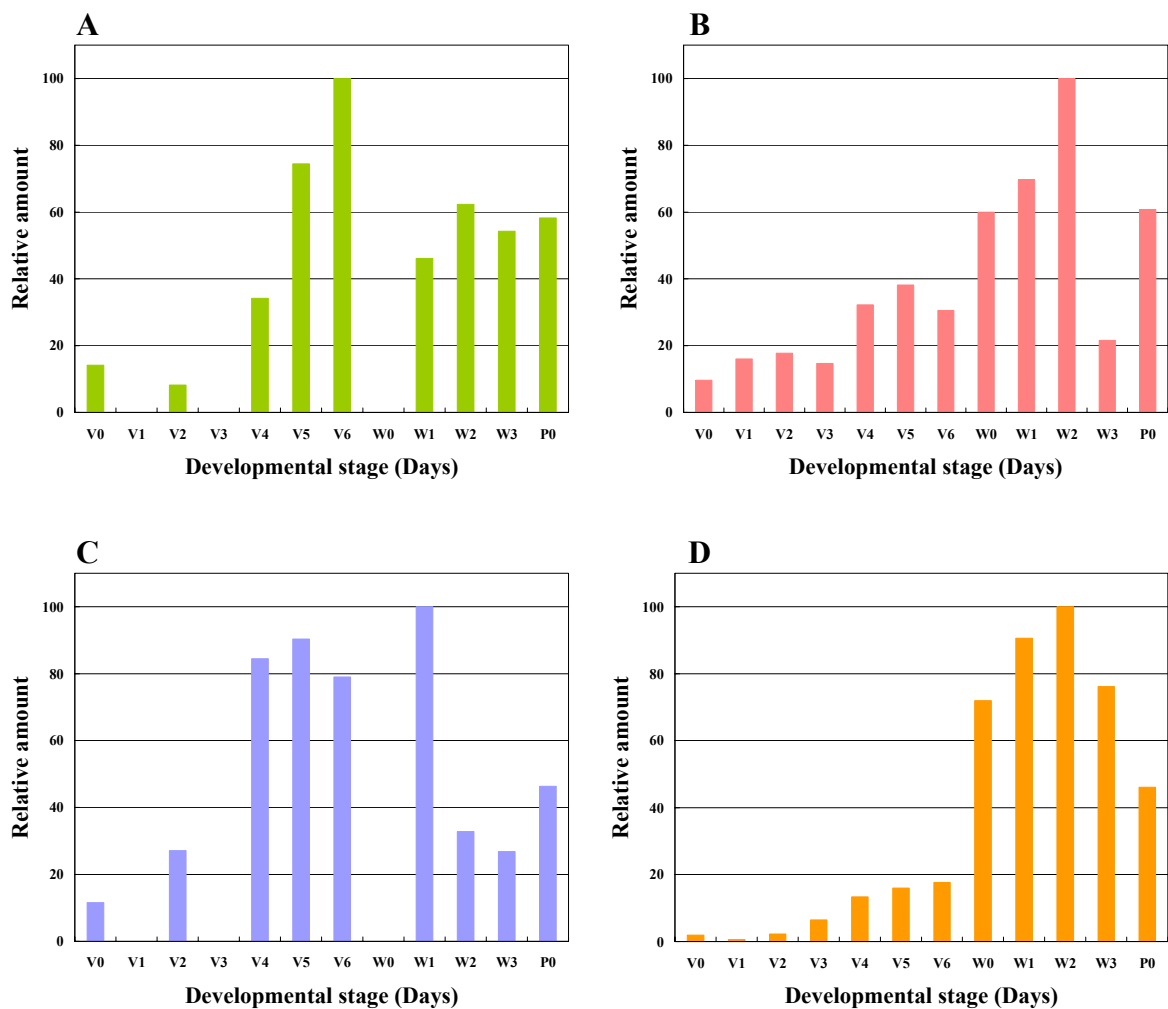
Fig. 2-2　カイコ５齢幼虫におけるエクジソン生合成関連遺伝子の発現量の変動。*Phm*（A）、*Dib*（B）、*Sad*（C）および、*Spo*（D）ノーザンブロットのバンドの濃さから算出した相対量を示す。W0-3 はワンダリングを始めて 1-3 日目を、P0 は蛹になって０日目をそれぞれ示す。（当研究室　並木俊樹のデータより）

第３章　培養前胸腺への **JH** アナログ **(**メソプレン**)** の影響

第１章で示したように、生体内の状態を保持していると考えられる培養初日における V0 前胸腺のエクジソン分泌量は少なかった (Fig. 1-6)。また、アラタ体との共培養では、エクジソン分泌が抑制された (Fig. 1-8)。このことから、５齢初期の前胸腺に対する抑制性の因子の影響に興味が持たれた。そこで、エクジソン分泌抑制など、前胸腺に対する作用が報告されている JH の培養前胸腺への影響を調べた。

JH の体内濃度は、４齢後半は約 10 nM の高い状態にあるが、５齢脱皮直後から１日の間に 10 nM から数 nM まで大きく減少し、５齢２日目から５日目までは低い状態（数百 pM）に保たれる (Sakurai and Niimi, 1997)。この体内 JH 濃度の変化を参考に、培養開始初日のみに JH アナログであるメソプレンを培地に添加した。

3-1. メソプレン濃度依存的なエクジソン分泌ピークの遅れ

メソプレンは、培養開始０日目の培地のみに 0.25nM / 2.5nM / 25nM / 1μM / 100μM（終濃度）加えた。以降、これをメソプレン添加培地とする。1 日後の培地交換以降は通常の培養用調製培地を用いて、７日間培養を行い、各日のエクジソン分泌量を測定した。

メソプレン無添加で培養したコントロール（以降、本章ではこれを「コントロール」と表記する。）の分泌ピークは５日目であった。これに対し、メソプレン添加培地で培養した前胸腺では、メソプレン濃度依存的な分泌ピークの遅れが見られた。JH の体内濃度に最も近い 2.5nM 及び、25nM ではピークは６日目に、1μM では７日目に、それぞれシフトした。2.5nM 及び、25nM ではピーク時の分泌量がコントロールと比較して多く、より高濃度にした場合は逆にコントロールよりも少なかった (Fig. 3-1)。
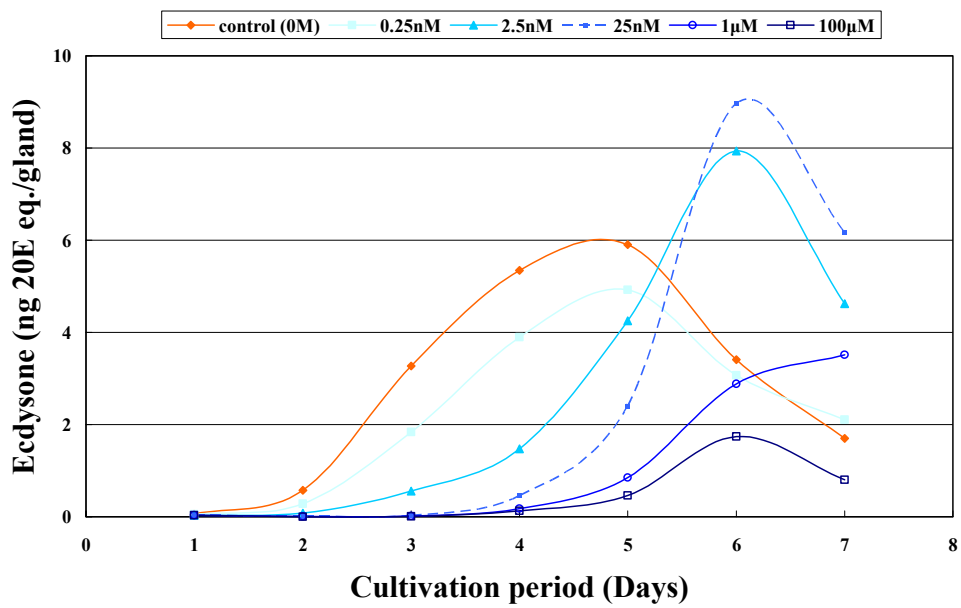
Fig. 3-1　メソプレン濃度依存的なエクジソン分泌ピークの遅れ。
培養０日目に各濃度のメソプレン添加培地を用いた前胸腺を７日間培養し、各日のエクジソン分泌量を測定した。平均値。n=26（コントロール）、6-14（メソプレン添加サンプル）

3-2. メソプレンによるエクジソン分泌抑制と **P450** 遺伝子発現量の変動

メソプレンの添加によって、エクジソン分泌ピークの遅れがみられた培養前胸腺における P450 遺伝子の発現量の変動を調べるため、メソプレン 添加培地で培養した前胸腺から total RNA を抽出し、real time-RT PCR を行った。

メソプレン濃度は 25 nM とし、前項と同様に、培養開始０日目にのみメソプレン添加培地を使用して前胸腺を培養した。２日目および３日目の培地交換時に前胸腺の半数を回収し、*Phm*、*Dib*、*Sad* および、*Spo* の発現量をコントロールと比較した。実験に用いたロットの分泌ピークは 4-5 日目であった。

Phm の発現量は、培養開始後３日目はメソプレン 添加培地で培養した前胸腺（以下、これを M^+ 前胸腺と表記する。）がコントロールを下回るが、２日目は逆に M^+ 前胸腺の方が上回っていた (Fig. 3-2A)。*Dib* の発現量は、M^+ 前胸腺とコントロールとの間にほとんど差がなかった (Fig. 3-2B)。*Sad* については、２日目および３日目の両方でコントロールを下回っていた (Fig. 3-2C)。遺伝子の発現量について、コントロールとの間に最も明確な相違がみられたのは、*Spo* の３日目の発現量であった。M^+ 前胸腺における *Spo* の発現量は、このロットではコントロールの約 20 分の１であった。これに対し、２日目の発現量にはほとんど差がなかった (Fig. 3-2D)。

A

B
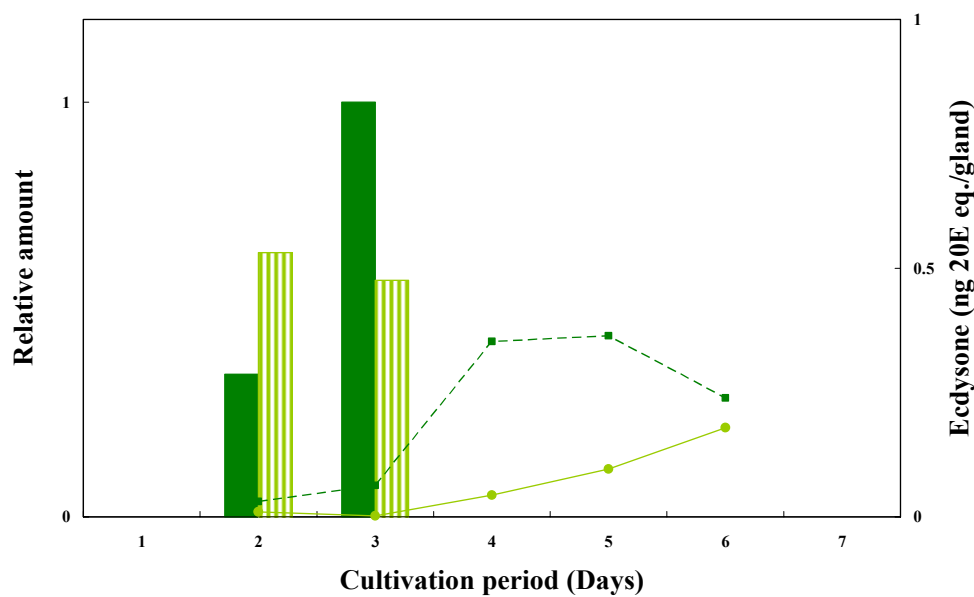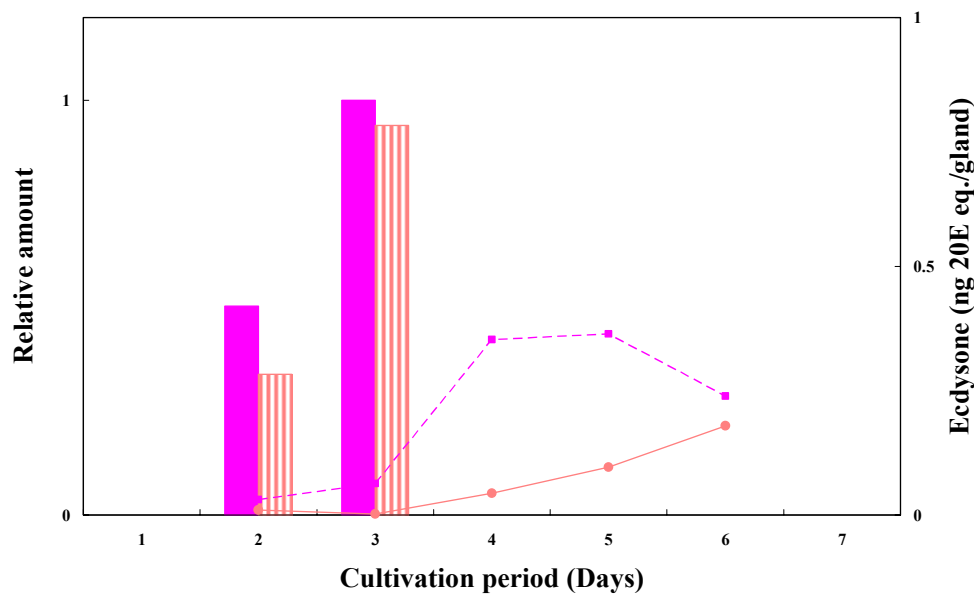
Fig. 3-2　メソプレンによるエクジソン分泌抑制と P450 遺伝子発現量の変動（その１）。棒グラフ：培養初日に 25nM メソプレン添加培地を使用した前胸腺における遺伝子発現量。右（縦縞）がメソプレンを添加したサンプル。左はコントロール。３日目のコントロールを１とする相対量で示した。折れ線グラフ：同じ条件で培養した同一ロットのエクジソン分泌量の変動。実線がメソプレンを添加したサンプル。点線はコントロール。*Phm* (A) 、*Dib* (B) 、*Sad* (C) 、*Spo* (D)。平均値。n=1*（発現量)、6（エクジソン分泌量）。

C

D
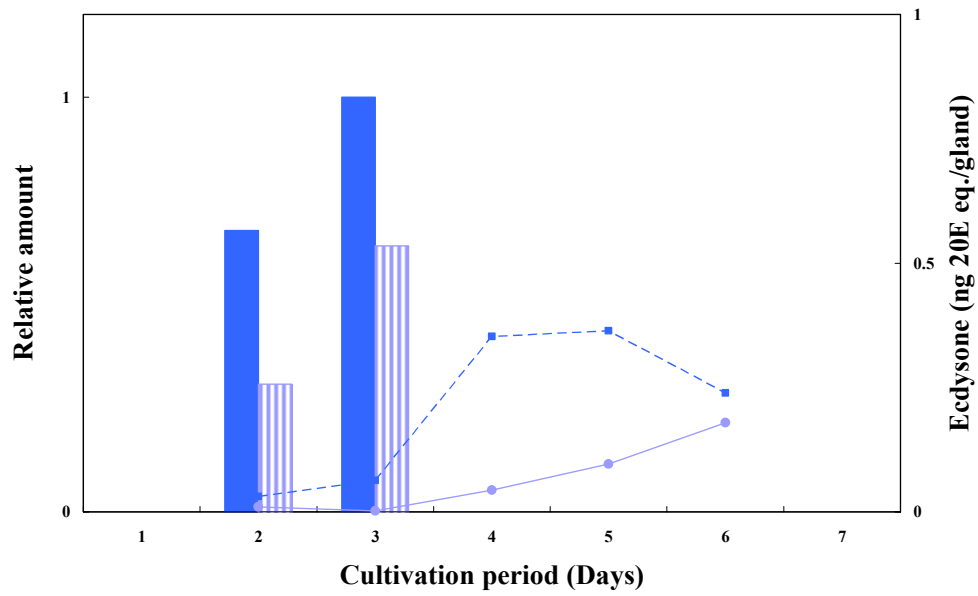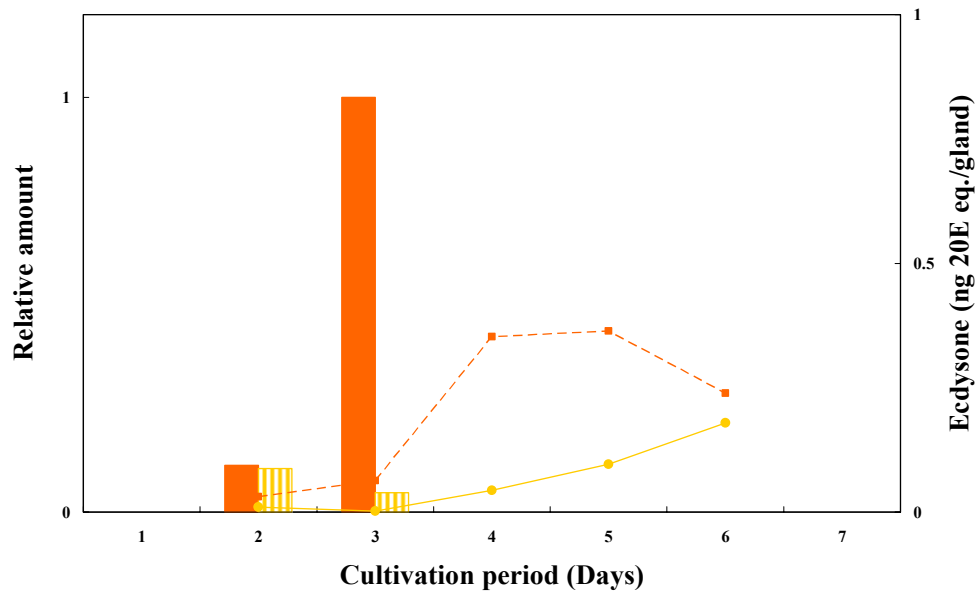
Fig. 3-2　メソプレンによるエクジソン分泌抑制と P450 遺伝子発現量の変動(その２)。

3-3. まとめと考察

メソプレン のエクジソン分泌抑制作用

培養系へのメソプレン 添加実験では、メソプレン 添加により メソプレン 濃度依存的なエクジソン分泌ピークの遅れがみられ、メソプレン が培養前胸腺に対して、エクジソン分泌抑制作用をもつことが示された。M^+ 前胸腺では、添加されたメソプレン によりエクジソン分泌が抑制されるが、培養開始１日後 メソプレン が除去されるとエクジソン分泌活性を回復し、分泌量が増大するものと考えられる。

５齢初期の前胸腺の不活性状態

培養開始０日目に、生体内に近い濃度のメソプレン を添加した培養前胸腺のエクジソン分泌ピークは１日後にシフトし、体内エクジステロイド濃度の変動に類似した変動パターンとなった。このことは、JH が５齢におけるエクジステロイドの体内濃度制御に関与することを強く示唆する。第１章で示したように、V0 、V4 、V6 幼虫から摘出した前胸腺のうち、解剖直前の JH の体内濃度が高い状態にあった V0 幼虫の前胸腺のみにおいて、初日のエクジソン分泌量が少なかった。このことからも５齢初期の前胸腺の不活性状態が JH の抑制作用によることが示唆される。生体内では、５齢２日目以降も JH が微量ながらも存在し続ける。今後、２日目以降の培地への メソプレン 添加実験により、各時期の JH の役割を明らかにしたい。

メソプレン の遺伝子発現への影響

P450 遺伝子の発現レベルの解析では、メソプレン添加によって発現レベルが変化しないものと、発現が強く抑制されるものがあることが示された。このように、遺伝子によって挙動が異なったことは、エクジソン生合成に関与するこれらの遺伝子が複数のメカニズムで発現制御を受けていることを示唆する。第２章の発現解析において、エクジソン分泌量の変動と正の相関を示していた *Dib* はメソプレン 添加によって発現レベルが変化しなかった。これに対し、エクジソン分泌量の変動との明確な相関を示さなかった *Sad* や *Spo* がメソプレンの影響を受けたことは、非常に興味深い。今後、 メソプレン あるいは、20E を添加した培養系における各遺伝子の発現量を調べ、これら遺伝子の発現制御における JH およびエクジステロイドの役割分担について解明を進めたい。

第４章　培養前胸腺における **RNAi**

P450 遺伝子の発現を抑制することによって、培養前胸腺のエクジソン分泌にどのような影響が表れるかを調べるため、RNA 干渉 (RNAi) を試みた。P450 遺伝子の 二本鎖 RNA (dsRNA) を作成し、Drosophila S2 細胞の RNAi 実験 (Clemens et al., 2000; Dobrosotskaya et al., 2002) を改変して、培地への dsRNA 添加による RNAi 実験を行った。

4-1. 培地への **dsRNA** 添加

dsRNA の添加は培養開始後１日目の培地交換時に行った。初めに、8-800 μg/ml （終濃度）の dsRNA を含む 25 μl の培地中で 1-6 時間培養（高濃度処理）した後、培養用調製培地で４倍に希釈 (終濃度 2-200μg/ml) し、その後２日間、同一の dsRNA 添加培地中で培養を行った。３日目の培地交換時に前胸腺の半数を回収し、注目する遺伝子の発現量を調べた。残りの半数は dsRNA を含まない通常の培養用調製培地で７日目まで培養を続け、各日の培地中エクジソン量を測定した。高濃度処理は高酸素濃度 (45-60%）条件下で行った。未処理のコントロールは、dsRNA を添加せずに 25 μl の培養用調製培地中で 1-6 時間培養した（コントロール１）。また、dsRNA 添加のコントロールには、*GFP* の dsRNA を使用し、同じ条件で高濃度処理と培養を行った（コントロール２）。

Phm 、*Sad* 、および、 *Spo* について、dsRNA の濃度および処理時間を変えて dsRNA の添加実験を行ったが、dsRNA 添加により明確に遺伝子発現量の低下とエクジソン分泌量の減少がみられたものはなかった。*Phm* および、*Sad* の RNAi 実験では、遺伝子量の明確な減少がみられなかった一方で、エクジソン分泌量が減少する傾向がみられた。*Sad* dsRNA 添加実験について Fig. 4-1 に示した。

200 μg/ml （希釈時）の *Sad* dsRNA を添加した場合 (*Sad* RNAi)、*Sad* 発現量はコントロール１と比較して、半分程度に減少していた。しかしながら、*GFP* の dsRNA を添加したコントロール２も同じ程度減少していた (Fig. 4-1A)。一方、エクジソン分泌量は、*GFP* dsRNA を添加したコントロール２ではコントロール１とほとんど差がないのに対し、*Sad* RNAi ではコントロール１と比べて減少していた(Fig. 4-1B)。

B

Ecdysone (ng 20E eq./gland)

1
0.75
0.5
0.25
0

0 1 2 3 4 5 6 7 8

Cultivation period (Days)
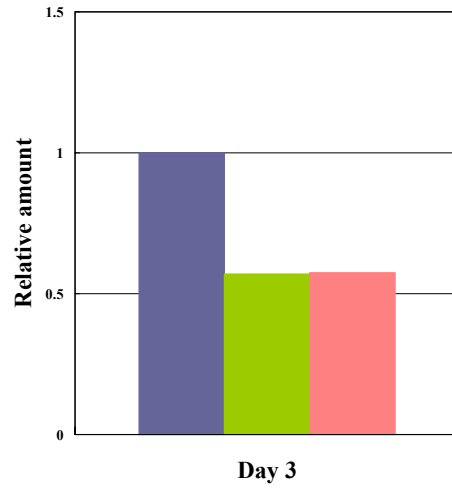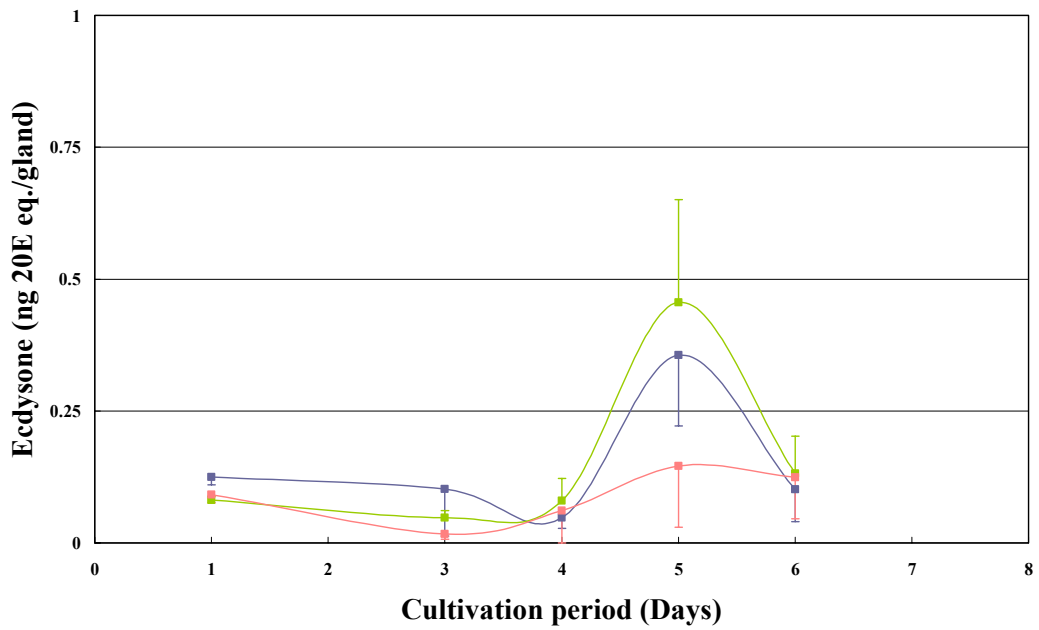
Fig. 4-1　*Sad* dsRNA 添加実験における *sad* 発現とエクジソン分泌。
A：培養開始後３日目の Sad 発現量。藍：コントロール１（未処理）。黄緑：コントロール２（*GFP* dsRNA 添加）。桃：*Sad* dsRNA を添加したサンプル（*Sad* RNAi)。コントロール１の前胸腺における発現量を１とした場合の相対量で示した。n=1(4)。B：各日のエクジソン分泌量。色は、A と同じ。n=4。

4-2. まとめと考察

今回の RNAi 実験では、培養開始後３～５日目にみられるエクジソン分泌ピークに対して dsRNA の添加が与える影響を調べた。エクジソン分泌量の変化は、遺伝子発現量が減少した１日～数日後に表れることが予想される。そこで、培養前半に dsRNA 処理を行い、エクジソン分泌量がピークを迎える直前の３日目に前胸腺を回収して遺伝子の発現量を調べた。しかしながら、明確な遺伝子量の減少およびエクジソン分泌量の減少はみられなかった。

dsRNA 添加のネガティブコントロールとして GFP dsRNA を添加したサンプル（コントロール２）において、培養３日目の *Sad* の遺伝子量が半減していた。このことは、培養系への高濃度の dsRNA 添加が、前胸腺細胞の生理機能の低下など、二次的な影響を与えている可能性を示唆するものである。今後、添加する dsRNA の濃度を低くして処理時間を長くするなど、dsRNA の添加方法や、濃度、および処理時間にさらなる改善を加え、最適な dsRNA 添加条件を決定したい。

Sad dsRNA を添加したサンプル (*Sad* RNAi) と、*GFP* dsRNA を添加したサンプル（コントロール２）の、培養３日目の *Sad* の遺伝子量はほぼ同じであった。にもかかわらず、５日目のエクジソン分泌ピークは、コントロール２はコントロール１と同程度であったのに対し、*Sad* RNAi では５日目のピークがほとんどみられなかった。このことは、培養３日目における *Sad* の発現量が、その２日後のエクジソン分泌ピークには反映されなかったことを示している。今後、dsRNA 添加培養系における遺伝子の発現量の変動を、日を追って調べ、エクジソン分泌量変化への影響の有無を明らかにしたい。

総括

本研究は、以下の２条件が培養系における前胸腺のエクジソン分泌能維持に有効であることを明らかにし、カイコ前胸腺の器官培養系の構築に成功した。

①酸素供給
②周辺組織との共培養

構築した培養系において、最も注目すべき発見は、V0 前胸腺が、生体内の調節因子の誘導によらずに、自発的にエクジソン分泌能を獲得した点であった。このことは、不活性化状態にある V0 幼虫の前胸腺が、エクジソン分泌能を獲得する機構において、エクジソン自体の正のフィードバック作用が関与することを示唆する。

培養系の V0 前胸腺における遺伝子の発現を解析すると、エクジソン生合成に関与する P450 遺伝子のうち、*Phm* や *Dib* はエクジソン分泌量の増大と正の相関を示して発現量が増大するのに対し、*Sad* は培養期間を通して一定量発現し続けていた。これらの特徴は生体内でみられる傾向に類似していたが、各遺伝子の発現量が増大する順序や時期については、生体内との相違がみられた。

構築した培養系は、注目する調節因子のみが存在する状況をつくり出せること、また、同一のサンプルを連続的に観察し、調節因子による長期的な作用を調べられることの２点において非常に有用である。

そこで、培養系の利用法として、本研究では、JH アナログであるメソプレンの添加実験を行った。一過的なメソプレンの添加は、一過的なエクジソン分泌抑制を引き起こした。V0 前胸腺の培養系に、生体内 JH 濃度に近い濃度のメソプレンを添加すると、エクジソン分泌のピークは培養後半にシフトし、メソプレンを添加しない場合の V0 前胸腺の変動パターンと比較して生体により類似したパターンとなった。このことは、５齢において、JH がエクジステロイドの体内濃度を制御している可能性を示唆する。

培養系のもうひとつの利用法として、本研究では最後に RNAi を試みた。しかしながら、遺伝子発現を抑制する RNAi 条件の決定には至らなかった。本研究で用いた品種、錦秋×鐘和は、個体へのインジェクションを用いた RNAi 法でも成功例が少ない。しかしながら、今回の P450 遺伝子の dsRNA 添加実験では、一部の遺伝子で、発現量の明確な減少はみられないものの、エクジソン分泌量の減少がみられた。この現象は、*GFP* dsRNA の添加によっては引き起こされなかった。このことは、今後、dsRNA の添加条件の改善により、構築

した培養系が RNAi 実験系として使用できる可能性を示している。

培養系そのものに関しても、さらなる改善が望まれる。培養系でみられるエクジソン分泌は比較的個体差が大きく、対照実験を行う際の障壁となった。前胸腺の摘出方法、培養条件について様々な検討を行ったが、現在までのところ、エクジソン分泌量をそろえるような条件はみつかっていない。なお、メソプレン添加による一過的なエクジソン分泌の抑制の後に見られたピーク時の分泌量は、サンプル間で比較的統一されていた。培養前半にエクジソン分泌が抑制されることで、培養開始時にばらついていた分泌活性が揃えられ、後半の分泌ピーク時の個体差を低減することができたものと思われる。

今回、構築に成功した前胸腺長期培養系は、エクジソン分泌の制御機構に関して、生体内の観察や短期培養では得ることのできなかった新しい知見を与えるであろう。エクジステロイドは、脱皮・変態だけでなく、胚発生、社会性昆虫のカースト分化、休眠など卵期から成虫期までの様々な生理現象を制御する多機能分子である。前胸腺長期培養系が、エクジソン分泌変動によって引き起こされる昆虫の様々な生理現象の解明に貢献すること、そして、数少ない昆虫細胞の RNAi 実験系として、今後さらに有用な手法に発展することを心から願う。

実験の部

動物

カイコ (*Bombyx mori*) の交雑品種である錦秋×鐘和を用いた。卵は上田養蚕業から購入し、25℃ の終日暗条件下で孵化させた。孵化した幼虫は、３齢脱皮までは 25℃の終日暗条件下で、それ以降は 16 L : 8 D の光周期条件下で飼育し、人工飼料である Silk Mate (Nihon Nosan Kogyo) を与えた。この飼育条件下においては、殆どの幼虫は孵化してから 18-20 日後に V0 を迎えた。

ステージングは４齢脱皮直後に行い、明期の開始直後に脱皮した幼虫を集め、これを５齢０日目 (V0) とした。４齢幼虫の多くは暗期に脱皮する。従って V0 集団は発育状態に最大８時間の差を有する集団である。そこで、幼虫の頭部の色を指標に V0 集団から更に被験個体の選別を行った。脱皮直後の幼虫の頭部は白色であるが、１～２時間後までに白褐色に変色する。選別は午前 10:00 ～ 12:00 の間に行い、同じ時間帯に頭部が白色であった V0 幼虫を集めて実験を行った。 V4 、V6 幼虫を用いる場合は、飼料を与える午前 10:00 に V4、V6 集団から無作為に選択した。

培養系への メソプレン 添加実験においては、同じ錦秋×鐘和の４眠幼虫を無菌養蚕システム研究所から購入し、上記と同様の条件で飼育したものを実験に用いた。

[第１章　前胸腺器官培養系の確立]

培地

Sigma-Aldrich Inc. から購入した Grace's Insect Medium を用いて、phenoloxydase の阻害剤を添加した解剖用培地、および培養用培地をそれぞれ調製して用いた。解剖用調製培地の組成は、５ mM Sodium N,N-Diethyldithiocarbamate Trihydrate ($C_5H_{10}NNaS_2$, DDTC, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) in Grace's Insect Medium である。培養用培地の組成は、１％ Penicillin-Streptomycin Solution (100 x) (Wako Chemicals USA, Inc.) 、２％ BSA (Sigma-Aldrich Inc.) in Grace's Insect Medium である。各培地は使用する直前に調製し、フィルター滅菌 (0.22 μm) して用いた。

前胸腺の摘出

解剖および前胸腺の摘出は、クリーンベンチ内に設置した実体顕微鏡を用いて、無菌的に行った。幼虫は 75％ エタノール中で２分間麻酔後、蒸留水２回で洗浄した。麻酔・洗浄した幼虫を解剖用調製培地（培地の項を参照）中で解剖し、左右の前胸腺をそれぞれ、

周辺組織を含めて摘出した。含まれる組織は以下の通り。前胸腺、気管、脂肪体、筋肉、皮膚。（以降、「単独」という表現を伴わない限り、前胸腺とは、周辺組織を含んだものを指す。）摘出した前胸腺は 600 μℓ の解剖用調製培地中で１分間洗浄し、その後 600 μℓ の解剖用調製培地中で 1-60 分プレインキュベートした。前胸腺単独培養の際は、上記操作の後、改めて解剖用調製培地中で、前胸腺を単離した。

培養

培養には 96 well 細胞培養用マイクロテストプレート　平底　低蒸発タイプ・フタ付　ポリスチレン (BD Falcon™) を使用した。前胸腺、単独前胸腺あるいは周辺組織を１片ずつ 100 μℓ の培養用調製培地（培地の項を参照）中で培養した。300×280×290 (mm) のガス置換デシケーター (AS ONE Corp.) に酸素を 70％まで充填してコルクを閉じると、デシケーター内の酸素濃度は１時間後には 45-60％まで低下し、その後 24 時間以上一定に保たれる。この方法で酸素を充填したデシケーター内に培養 96 well プレートを置き、26℃、光周期 16 L：8 D 、酸素濃度 45-60％の高酸素濃度条件で培養した。これに対し、低酸素濃度条件では、培養 96 well プレートをカイコ用 25 ℃インキュベーター内に置き、25℃、酸素濃度 20.9％で培養した。24 時間ごとにデシケーターへの酸素充填を行うと同時に培地を交換し、これをラジオイムノアッセイ (RIA) のサンプルとした。デシケーター内の酸素濃度は、標準型酸素モニタ (Taiei Electric Co., Ltd.) で測定、管理した。

ラジオイムノアッセイ (RIA) による培地中エクジソン量の測定

培地交換の際に収集した培地をサンプルとして Scintillation Proximity Assay (SPA) Anti-Rabbit Reagent (Amersham Biosciences Corp.) を用いた RIA を行った。RIA では、放射ラベルされた既知量のリガンドと、ラベルされていない（非放射ラベルの）リガンドの、特異的抗体に対する競合作用を利用して、サンプル中のリガンド量を測定する。本実験で用いた Scintillation Proximity Assay では、イットリウムを含む蛍光小球体の表面に結合した二次抗体に、蛍光ラベルされたリガンドが 1 次抗体を介して結合した場合のみに、蛍光が発生し、液体シンチレーションカウンタでこれを測定できる。非放射ラベルのリガンド量が多いほどその競争阻害によって、蛍光量は減少する。1 次抗体には、当研究室で所有していた抗 20-Hydroxyecdysone (20E) 抗体を用いた。反応プロトコルは SPA Reagent の取扱説明書を参考に、以下に示す２分の１ボリュームの改変プロトコルで行った。

抗 20E 抗体 は、原液をエクジソンアッセイ用 Borate buffer (0.5％ BSA 、0.05％ Sodium azide 、50 mM Borate 、pH 8.6) で 3000 倍に希釈し用いた。 SPA Reagent については、取扱説明書に従い 50 ml のエクジソンアッセイ用 Borate buffer に溶解した Reagent を更にエクジソンアッセイ用 Borate buffer で２倍に希釈して用いた。スタンダードの 20E は

Sigma-Aldrich Inc. から購入し、エクジソンアッセイ用 Borate buffer を用いて 50 μl 当たり 5-1000 pg の希釈系列を作成した。培地サンプルについては必要に応じてエクジソンアッセイ用 Borate buffer で希釈した。

液体シンチレーションカウント用バイアル (ZINSSER ANALYTIC GmbH) に、希釈した１次抗体、SPA Reagent 、培地サンプル（又はスタンダード）を 50 μl ずつ添加し、ここに、エクジソンアッセイ用 Borate buffer に溶解した Ecdysone, α–[23,24-^{3}H(N)]- (PerkinElmer Life Science, Inc.) 10000 cpm 等量を加え、反応液の合計量を 200 μl とした。バイアルを 25 ℃、200 rpm で 17 時間振とうした後、液体シンチレーションカウンタ LSC-6100 (ALOKA Co., Ltd.） で蛍光を測定した。スタンダードの 20E について、蛍光量 (cpm) - 20E 量 (pg) の対数値をプロットして検量線を作成し、各培地サンプル中のエクジソン量を算出した。得られた結果は、前胸腺１個当たりの１日の分泌量 (ng 20E eq./gland) で表した。RIA の検出限界は 0.005 ng であるので、 培地中エクジソン量の検出限界は、0.001 ng/gland である。

[第２章　培養前胸腺における遺伝子発現の確認]

<u>前胸腺からの total RNA 抽出および cDNA 作成</u>

各条件で培養した前胸腺から前胸腺を摘出し、ドライアイス上で冷却したチューブ内に回収、凍結した。摘出は Grace’s Insect Medium または生理食塩水 (0.75％ NaCl) 中で行った。1-6 個体から回収した 2-12 個の前胸腺をチューブに集め、total RNA を抽出した。前胸腺は TRIZOL Reagent (GIBCO BRL) 中で 26 gauge needle (TERUMO Corp.) に通すことで粉砕した。各サンプルから、Phenol / Chloroform 処理、Ethanol 沈殿により、total RNA を回収し、DEPC water 8-10 μl に溶解した。これを RQ1 RNase-free DNase (Promega) で処理した後、改めて Phenol / Chloroform 処理、Ethanol / 3 M AcONa 沈殿により total RNA を回収し、DEPC water 5-10 μl に溶解した。（-80℃で保存）

cDNA 作成には、Superscript Ⅲ RNase H^{-} Reverse Transcriptase (Invitrogen Corp.) を用い、反応プロトコルは取扱説明書に従った。RNA 量は比較するサンプルごとに 0.1-1 μg に揃えた。始めに 100 μM oligo dT primer 0.5 μl 、2.5 mM NTP Mix 4 μl 、RNA を混合し、蒸留水で 13 μl にフィルアップした。これを、65℃で５分間熱処理し、氷上に 1 分放置した後、５×First strand buffer ４ μl 、0.1 M DTT １ μl 、RNase Inhibiter (Amersham Biosciences Corp.) １ μl 、Superscript Ⅲ RNase H^{-} Reverse Transcriptase １ μl を加え、50℃で 60 分間反応させ、引き続いて 75℃で 15 分間熱処理して酵素を失活させた。得られた cDNA 溶液 に E.coli RNase H (Invitrogen Corp.) １ μl を加え、 37℃で 20 分間反応させた後、TE Buffer（10 mM Tris-Hcl 、1 mM EDTA 、pH 8.0）180 μl に溶解し、-20℃で保存した。

RT－PCR

作成した cDNA 溶液を Template とし､各遺伝子の ORF 内に設計されたプライマーを用いて RT-PCR を行った。内部標準としては、カイコ *ribosomal protein L3* (*rpL3*) を用いた。各プライマーの配列は次の通り。

Cyp306a1-Bm/Phm

Upper：5'-GACCCAACGGCACTGTATATGAGAG-3'

Downer：5'-GCCCACTGCAATGGGATCAC-3'

Cyp302a1-Bm/Dib

Upper：5'-CGATACAACAGCCTACACGACAAGCTTCG-3'

Downer：5'-CCTTCTGCAGCCATCTACCTATTCCAATCG-3'

Cyp315a1-Bm/Sad

Upper：5'-TAGAGCTCAAAGTGG-3'

Downer：5'-TGTCGTATCTCCAGCGGCG-3'

Cyp307a1-Bm/Spo

Upper：5'-AAGGAAGACCGTGCGGTGG-3'

Downer：5'-TGGAAGCGCAGGAAGTCCG-3'

rpL3

Upper：5'-CGTCGTCATCGTGGTAAGGTCAAG-3'

Downer：5'-GGTCTCAATGTATCCAACAACACCGACAC-3'

Template 1 μl に対して、10 μM 5' primer 0.2 μl 、10 μM 3' primer 0.2 μl 、Ex Taq (TAKARA) 0.2 μl 、10× buffer 2 μl 、2 mM dNTP mix 2 μl 、蒸留水 14.4 μl を加え、total 20 μl で反応を行った。反応条件は次の通り。 95℃ 2分、[95℃ 10 秒、68℃ 20 秒] × 30-45 サイクル、4℃ ∞。但し、*Cyp315a1-Bm/Sad* については、次の条件で反応を行った。 95℃ 2分、[95℃ 10 秒、60℃ 20 秒] × 30-45 サイクル、4℃ ∞。各サンプルについて、反応液 9 μl を用いてアガロースゲル電気泳動 (1% Agar 、 200 ng/ml Ethidium bromide 。100 V 、15-20 分。以下記載のないものは全て同じ条件で行った。) を行い、標的遺伝子のバンドを確認した。

Real time-RT PCR

作成した cDNA 溶液を Template として Real time-RT PCR を行った。プライマーは RT-PCR で使用したものと同じものを用いた（配列は RT-PCR の項を参照)。Template 1 μl に対して、10 μM 5' primer 0.75 μl 、10 μM 3' primer 0.75 μl 、Ex Taq (TAKARA) 0.25 μ

l 、5× buffer (Mg^{2+} free) 5 μl 、10 mM dNTP mix 0.75 μl 、250 mM Mg^{2+} Solution 0.3 μl 、蒸留水 13.7 μl を加え、total 25 μl で反応を行った。Cyp302a1-Bm/Dib については、Template 2 μl に対して、10 μM 5' primer 0.25 μl 、10 μM 3' primer 0.25 μl 、Ex Taq (TAKARA) 0.25 μl 、5× buffer (Mg^{2+} free) 5 μl 、10 mM dNTP mix 0.75 μl 、250 mM Mg^{2+} Solution 0.5 μl 、蒸留水 15.5 μl を加え、total 27 μl で反応を行った。反応条件は次の通り。*Cyp306a1-Bm/Phm* 及び *Cyp307a1-Bm/Spo* : 95℃ 1分、[95℃ 10 秒、68℃ 20 秒] × 40 サイクル、Melt 60-95℃ 、*Cyp302a1-Bm/Dib* : 95℃ 20 秒、[95℃ 5 秒、68℃ 20 秒] × 45 サイクル、Melt 60-95℃ 、 *Cyp315a1-Bm/Sad* : 95℃ 1分、[95℃ 15 秒、60℃ 30 秒] × 45 サイクル、Melt 60-95℃。

遺伝子の発現量は、蛍光強度が閾値に達するサイクル数（C_T値）の差ΔC_Tを用いて次の様に求めた。C_{TX} : サンプルの標的遺伝子の Ct 値、C_{TR} : 内部標準（カイコ rpL3）の C_T 値とすると、標的遺伝子と内部標準の Ct 値の差ΔC_T は、$\Delta C_T = C_{TX} - C_{TR}$ で表される。更に、$\Delta C_{T,cb}$: 基準サンプルのΔC_T 、$\Delta C_{T,q}$: 比較サンプルのΔC_T として、$\Delta C_{T,q} - \Delta C_{T,cb} = \Delta\Delta C_T$ で表すと、基準サンプルに対する比較サンプルの遺伝子の相対量は、$2^{-\Delta\Delta C_T}$ で表される。Fig. 2- では遺伝子量が最も多かった日を、また、Fig. 3- 及び Fig. 4- では、未処理のコントロールを基準（=1）とした。

[第３章 培養系への JH アナログ （メソプレン） の添加]

<u>メソプレン添加培地の調製</u>

メソプレン添加実験においては、100 mM メソプレン in Ethanol (Dr. Ehrenstorfer GmbH) を培養用調製培地で 0.25 nM ～ 1 mM に希釈し、培地とした。これらの培地には最大 (１ mM メソプレン) で１％の Ethanol が含まれることから、１％ Ethanol in Grace's Insect Medium をネガティブコントロールとした。メソプレン添加培地はその日に使用する分量だけを、使用直前に調製した。

<u>培養系への メソプレン添加</u>

培養開始０日目の培地に メソプレン 0.25nM / 2.5nM / 25nM / 1μM / 100μM（終濃度）を加え（メソプレン添加培地）、培養を行った。各前胸腺は、1 日目の培地交換の前に 600 μℓ の解剖用調製培地中で 1 分間洗浄してから、メソプレンを含まない通常の解剖用調製培地へ移し、以降 7 日目まで、通常の解剖用調製培地で培養した。37 個体から摘出した前胸腺 74 個を各濃度 6-14 個ずつ培養し、各日のエクジソン分泌量を測定した。コントロールとして、同ロットの 13 個体から摘出した前胸腺 26 個を、メソプレンを添加せずに培養し、

各日の エクジソン分泌量を測定した。25nM メソプレン添加培地で培養したものについて、2-5 日目に前胸腺を回収し、注目する遺伝子の発現量を未処理コントロールと比較した。なお、本実験では、無菌養蚕システム研究所から購入した錦秋×鐘和 V0 幼虫を用いた。

[第４章　培養前胸腺に対する RNAi]

dsRNA の作成

標的とした P450 遺伝子の ORF 内部 460-744 残基に対する dsRNA および、ネガティブコントロールとした GFP の dsRNA を作成した。設計した各 dsRNA 用プライマーは各標的配列の末端 23 残基と T7 RNA polymerase promoter site の配列 27 残基 (5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGACCAC-3') を含む。配列は次の通り。

Cyp306a1-Bm/Phm

Upper：5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCCTTGGGGGTTACCTATCGTCGG-3'

Downer：5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCGTGAGGAGCATATTCGGCTCCC-3'

Cyp315a1-Bm/Sad

Upper：5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCGACATGCGTCACAAGCAATTAG-3'

Downer：5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACGTATAAGCTGTCGTATCTCCAGC-3'

Cyp307a1-Bm/Spo

Upper：5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACGCTCGACAGATTCAAAGGTGCCG-3'

Downer：5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCTTAGAAGGAAGACCGTGCGGTG-3'

GFP

Upper：5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTT-3'

Downer：5'–TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACTTTGTATAGTTCATCCATGCCA-3'

初めに、各遺伝子の ORF のみが組み込まれたベクターを Template として、PCR 反応を行い、dsDNA を作成した。Template ２ ng に対して、10 μM ５'primer １ μl 、10 μM ３'primer １ μl 、Ex Taq (TAKARA) 0.4 μl 、10× buffer ８ μl 、2.5 mM dNTP mix 6.4 μl を加え、蒸留水で total 80 μl にフィルアップし、反応液とした。反応条件は次の通り。94℃ 5 分、[94℃ 30 秒、66℃ 30 秒、72℃ １分] × ５サイクル、[94℃ 30 秒、70℃ 30 秒、72℃ １分] × 50 サイクル、72℃ ７分、４℃ ∞。PCR 効率を高めるため、反応液は８連チューブに 20 μlずつ分注して反応を行った。PCR 反応液全てを、アガロースゲル電気泳動し、Wizard SV Gel and PCR Clean-up system (Promega Corp.) を用いたゲル抽出により dsDNA を回収した。ゲル抽出のプロトコルは取扱説明書に従った。回収した dsDNA は 25 μl の DEPC water に溶解し、濃度を測定した。

続いて、この dsDNA をテンプレートとして、MEGAscript T7 High Yield Transcription Kit (Ambion Inc.) を用いて dsRNA を作成した。１μg 相当のテンプレート DNA に対し、ATP solution 、GTP solution 、CTP solution 、UTP solution 各２μl 、10× Reaction buffer ２μl 、及び T7 enzyme mix ２ μl を加え、DEPC water で 20 μl にフィルアップして 37℃のエアインキュベータ内で 4-16 時間の反応を行った。DNase I 処理（２ U 添加、75℃ ５分反応）した後、Phenol / Chloroform 処理、Ethanol/８M LiCl 沈殿により dsRNA を回収した。一部をアガロースゲル電気泳動して、単一バンドであることを確認した後、２ μg/μl となるように DEPC water に溶解し、-20℃で保存した。

dsRNA は使用直前に改めて Ethanol 沈殿で回収してから培養用調製培地に溶解し用いた。

培養系前胸腺の RNAi

作成した dsRNA を培養用調製培地に添加し、RNAi 実験を行った。dsRNA 添加条件は S2 細胞を用いた RNAi 実験を参考に、次のように行った。

条件Ｉ：培養開始後１日目の培地交換時に dsRNA を添加した。初めに、0.2-20 μg の dsRNA を含む培養用調製培地 25 μl 中で１-６ 時間培養（高濃度処理）した後、75 μl の培養用調製培地を加え希釈した。高濃度処理時の dsRNA 濃度は、8-800 μg/ml 、希釈後は、2-200μg/ml である。培養開始から２日目の培地交換は行わず、２日間同一の dsRNA 培地中で培養を行った。３日目の培地交換時に前胸腺の半数を回収し、注目する遺伝子の発現量を未処理コントロールと比較した。３日目以降は再び通常の培養用調製培地で７日目まで培養を続け、各日の培地中 エクジソン 量を測定した。高濃度処理の際は、培養組織片の皮膚側を上にし、前胸腺が完全に培養液に浸るようにした。また、ネガティブコントロールとして、前胸腺を通常の培養用調製培地 25 μl 中で６時間培養した後、75 μl の培養用調製培地を加えて同様に培養した。高濃度処理および７日間の培養は全て高酸素濃度（45-60%）条件で行った。

条件Ⅱ：培養開始後１日目および２日目の培地交換時に２回 dsRNA を添加した。初めに、２ μg の dsRNA を含む培養用調製培地 25 μl 中で 2.5 時間培養（高濃度処理）し、その後 75 μl の培養用調製培地を加えた。２日目も培地交換し、同様の処理を行った。高濃度処理時の dsRNA 濃度は、80 μg/ml 、希釈後は、40μg/ml である。その他の点は条件Ｉと同様に行った。

参考文献

Bollenbacher, W. E., Agui, N., Granger, N. A., and Gilbert, L. I. (1979). In vitro activation of insect prothoracic glands by the prothoraciotropic hormone. Proc Natl Acad Sci U S A *76*, 5148-5152.

Bollenbacher, W. E., Vedeckis, W. V., and Gilbert, L. I. (1975). Ecdysone titers and prothoracic gland activity during the larval-pupal development of Manduca sexta. Dev Biol *44*, 46-53.

Chavez, V. M., Marques, G., Delbecque, J. P., Kobayashi, K., Hollingsworth, M., Burr, J., Natzle, J. E., and O'Connor, M. B. (2000). The Drosophila disembodied gene controls late embryonic morphogenesis and codes for a cytochrome P450 enzyme that regulates embryonic ecdysone levels. Development *127*, 4115-4126.

Chino, H., and Sakurai, S. (1974). Biosynthesis of α-Ecdysone by Prothoracic Glands in vitro. Science *183,* 529-530.

Clemens, J. C., Worby, C. A., Simonson-Leff, N., Muda, M., Maehama, T., Hemmings, B. A., and Dixon, J. E. (2000). Use of double-stranded RNA interference in Drosophila cell lines to dissect signal transduction pathways. Proc Natl Acad Sci U S A *97,* 6499-6503.

Dedos, S. G., and Fugo, H. (1996). Effects of fenoxycarb on the secretory activity of the prothoracic glands in the fifth instar of the silkworm, Bombyx mori. Gen Comp Endocrinol *104,* 213-224.

Dobrosotskaya, I. Y., Seegmiller, A. C., Brown, M. S., Goldstein, J. L., and Rawson, R. B. (2002). Regulation of SREBP processing and membrane lipid production by phospholipids in Drosophila. Science *296,* 879-883.

Gilbert, L. I. (2004). Halloween genes encode P450 enzymes that mediate steroid hormone biosynthesis in Drosophila melanogaster. Mol Cell Endocrinol *215,* 1-10.

Gilbert, L. I., Rybczynski, R., and Warren, J. T. (2002). Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway. Annu Rev Entomol *47,* 883-916.

Hua, Y. J., Tanaka, Y., Nakamura, K., Sakakibara, M., Nagata, S., and Kataoka, H. (1999). Identification of a prothoracicostatic peptide in the larval brain of the silkworm, Bombyx mori. J Biol Chem *274,* 31169-31173.

Komiya, K., Agui, N., and Mitsuhashi, J. (1998). Effect of culture medium on the in vitro secretion activity of prothoracic glands from Pseudaletia separata. Arch Insect Biochem Physiol *38,* 147-154.

Koolman, R.-J. J. a. J. (1999). Feedback inhibition of ecdysteroids: Evidence for a short feedback loop repressing steroidogenesis. Arch Insect Biochem Physiol *41,* 54-59.

Liu, X., Tanaka, Y., Song, Q., Xu, B., and Hua, Y. (2004). Bombyx mori prothoracicostatic peptide inhibits ecdysteroidogenesis in vivo. Arch Insect Biochem Physiol *56,* 155-161.

Mizoguchi, A., Dedos, S. G., Fugo, H., and Kataoka, H. (2002). Basic pattern of fluctuation in hemolymph PTTH titers during larval-pupal and pupal-adult development of the silkworm, Bombyx mori. Gen Comp Endocrinol *127,* 181-189.

Mizoguchi, A., and Kataoka, H. The mechanisms that regulate prothoracic gland activity in the early fifth instar of the silkworm B*ombyx mori:* an in vitro study. in preparation.

Mizoguchi, A., Ohashi, Y., Hosoda, K., Ishibashi, J., and Kataoka, H. (2001). Developmental profile of the changes in the prothoracicotropic hormone titer in hemolymph of the silkworm Bombyx mori: correlation with ecdysteroid secretion. Insect Biochem Mol Biol *31,* 349-358.

Niwa, R., Matsuda, T., Yoshiyama, T., Namiki, T., Mita, K., Fujimoto, Y., and Kataoka, H. (2004). CYP306A1, a cytochrome P450 enzyme, is essential for ecdysteroid biosynthesis in the prothoracic glands of Bombyx and Drosophila. J Biol Chem *279,* 35942-35949.

Okuda, M., Sakurai, S., and Ohtaki, T. (1985). Activity of the prothoracic gland and its sensitivity to prothoracicotropic hormone in the penultimate and last-larval instar of bombyx mori. J Insect Physiol *31,* 455-461.

Petryk, A., Warren, J. T., Marques, G., Jarcho, M. P., Gilbert, L. I., Kahler, J., Parvy, J. P., Li, Y., Dauphin-Villemant, C., and O'Connor, M. B. (2003). Shade is the Drosophila P450 enzyme that mediates the hydroxylation of ecdysone to the steroid insect molting hormone 20-hydroxyecdysone. Proc Natl Acad Sci U S A *100,* 13773-13778.

Sakurai, S., and Niimi, S. (1997). Development changes in juvenile hormone and juvenile hormone acid titers in the hemolymph and in-vitro juvenile hormone synthesis by corpora allata of the

silkworm, Bombyx mori. J Insect Physiol *43,* 875-884.

Sakurai, S., Okuda, M., and Ohtaki, T. (1989). Juvenile hormone inhibits ecdysone secretion and responsiveness to prothoracicotropic hormone in prothoracic glands of Bombyx mori. Gen Comp Endocrinol *75,* 222-230.

Sakurai, S., and Williams, C. M. (1989). Short-loop negative and positive feedback on ecdysone secretion by prothoracic gland in the tobacco hornworm, Manduca sexta. Gen Comp Endocrinol *75,* 204-216.

Satake, S., Kaya, M., and Sakurai, S. (1998). Hemolymph ecdysteroid titer and ecdysteroid-dependent developmental events in the last-larval stadium of the silkworm, Bombyx mori: role of low ecdysteroid titer in larval-pupal metamorphosis and a reappraisal of the head critical period. J Insect Physiol *44,* 867-881.

Stolarz, B. C. a. G. (1979). The role of juvenile hormone during larval-pupal transformation if s*podoptera littoralis:* Switchover in the sensitivity of the prothoracic gland to juvenile hormone. J Insect Physiol *25,* 939-942.

Takaki, K., and Sakurai, S. (2003). Regulation of prothoracic gland ecdysteroidogenic activity leading to pupal metamorphosis. Insect Biochem Mol Biol *33,* 1189-1199.

Warren, J. T., Petryk, A., Marques, G., Jarcho, M., Parvy, J. P., Dauphin-Villemant, C., O'Connor, M. B., and Gilbert, L. I. (2002). Molecular and biochemical characterization of two P450 enzymes in the ecdysteroidogenic pathway of Drosophila melanogaster. Proc Natl Acad Sci U S A *99,* 11043-11048.

Wismar, J., Habtemichael, N., Warren, J. T., Dai, J. D., Gilbert, L. I., and Gateff, E. (2000). The mutation without children(rgl) causes ecdysteroid deficiency in third-instar larvae of Drosophila melanogaster. Dev Biol *226,* 1-17.

石井象二郎．昆虫生理学 (*培風館*, 1982)

大西英爾．園部治之．高橋進. (ed.) 昆虫の生化学・分子生物学 (*名古屋大学出版会*, 1995).

謝辞

本研究を行うにあたり、片岡宏誌教授、東原和成助教授両氏には、恵まれた研究環境を与えて頂くとともに、常に適切な指導で私の研究活動を導いて下さったことを、心より感謝いたします。前胸腺培養系の構築にあたっては、溝口明教授にご指導を賜り、また、データの考察においてもさまざまなアドバイスを頂きました。心より感謝いたします。山中直岐さんは私の研究を最も理解し、２年間の研究活動を全面的に支えて下さいました。貴重な時間を割いて、要領を得ない私とのディスカッションにいつも快く応じて下さったこと、深く感謝いたします。カイコ幼虫における P450 遺伝子発現のデータを下さった並木俊樹さん、RNAi 実験系の条件検討にあたり、相談にのっていただいた作道隆さんに心より感謝いたします。分子認識化学研究室の皆様には大変お世話になりました。研究への深い熱意と、積極的な姿勢、そしてめりはりのきいた生活スタイルで、活発な研究生活を送っていらっしゃる皆様とともに過ごした２年間は刺激に溢れ、研究活動にとどまらない様々なことを学ばせて頂く、忘れがたい体験となりました。深く感謝いたします。

最後になりましたが、寄り道の多い私の歩みを理解し、率直なアドバイスと全面的なサポートで私の学生生活のすべてを支えてくれた両親と兄弟に心から感謝いたします。